

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. W. Kersten

Zytostatische Chinone – Vergleichende Untersuchungen zur Hemmung der Protein-, DNA- und RNA-Synthese in Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Wolfgang Kroczek
aus Erlangen

19074



Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. W. Kersten

Zytostatische Chinone – Vergleichende Untersuchungen zur Hemmung der Protein-, DNA- und RNA-Synthese in Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Wolfgang KroczeK
aus Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. A. Ogilvie
Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.1984

für Carola

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1. Hemmstoffe	7
2.1.1. ACDOC	7
2.1.2. 3105	8
2.1.3. Benzochinon	10
2.1.4. Naphthochinon	11
2.1.5. Chlorhydroxychinolin	12
2.1.6. Menadion	14
2.1.7. Herstellung der Hemmstofflösungen	15
2.1.8. Konzentrationsbestimmung der Hemmstofflösungen	16
2.2. Puffer und Lösungen	17
2.2.1. Radioaktiv markierte Substanzen und deren Stammlösungen	17
2.2.2. Puffer	19
2.2.3. Aminosäuregemisch	20
2.2.4. Szintillatorflüssigkeit	22
2.2.5. Weiteres Material und Geräte	22
2.3. Zellmaterial	23
2.4. Zellzüchtung und Präparation	23
2.4.1. Vermehrung in der Maus	23
2.4.2. Bestimmung der Zellmenge	25
2.4.3. Fremd- und Totzellen	26
2.4.4. Präparation der Zellen	27
2.5. Markierung der Zellen mit radioaktiven Vorstufen	29
2.5.1. Prinzip	29
2.5.2. Durchführung	30
2.5.3. Vereinfachte Zellaufarbeitung	34
2.6. Aminoacylierung von tRNA in vitro	36

3. Ergebnisse	38
3.1. Vorversuche	38
3.1.1. Messung der RNA- und Proteinsynthese von EAT-Zellen in EBSS-Puffer mit und ohne Calcium	38
3.1.2. RNA- und Proteinsynthese in EAT-Zellen und deren Hemmung durch ACDOC bei Inkubation in verschiedenen Puffern	39
3.1.3. Vergleich der säurefällbaren Radioaktivitätsmengen bei EAT-Zellinkubation mit einer ^{14}C -Phenylalanin-Einbaulösung mit erhöhter spezifischer Radioaktivität	41
3.1.4. Hydrolyse der Nukleinsäuren durch Trichloressigsäure nach Einbau von ^3H -Uridin	42
3.1.5. Längeres Einfrieren der Proben während der Aufarbeitung	43
3.2. Untersuchungen des Chinons 3105	44
3.2.1. Wirkung von 3105 im aminosäurehaltigen Inkubationsmedium auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen	45
3.2.2. Wirkung von 3105 im aminosäurefreien Inkubationsmedium auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen	49
3.2.3. Hemmung des Thymidin-Einbaus durch 3105 bei Inkubation der EAT-Zellen mit Aminosäuren	51
3.3. Untersuchung von Benzochinon	54
3.3.1. Beeinflussung der RNA- und Proteinsynthese durch Benzochinon bei Inkubation der EAT-Zellen im aminosäurehaltigen Inkubationspuffer	54
3.3.2. Wirkung von Benzochinon im aminosäurefreien Medium auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen	56
3.3.3. Einfluß von Benzochinon auf den Thymidin-Einbau der EAT-Zellen im aminosäurehaltigen Medium	59
3.3.4. Wirkung von Benzochinon auf den Thymidin-Einbau der EAT-Zellen im Aminosäuremangel	61
3.4. Untersuchung von Naphthochinon	64
3.4.1. Wirkung von Naphthochinon auf die RNA- und Proteinsynthese von EAT-Zellen in Gegenwart von Aminosäuren	64

3.4.2. Wirkung von Naphthochinon auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen im aminosäurefreien Medium	66
3.4.3. Beeinflussung des Thymidin-Einbaus durch Naphthochinon bei Inkubation der EAT-Zellen mit Aminosäuren	69
3.4.4. Einfluß von Naphthochinon auf den Thymidin-Einbau der EAT-Zellen bei Aminosäuremangel	71
3.5. Untersuchung von Chlorhydroxychinolin	74
3.5.1. Einfluß von Chlorhydroxychinolin auf die RNA- und Proteinsynthese von EAT-Zellen bei Aminosäure-Zugabe und Aminosäure-Mangel	74
3.6. Untersuchung von Menadion	76
3.6.1. Wirkung von Menadion auf die RNA- und Proteinsynthese von EAT-Zellen bei Inkubation im aminosäurehaltigen Medium	76
3.7. Einfluß einzelner Aminosäuren auf die Einbauhemmung durch ACDOC	79
3.7.1. Testung der einzelnen Aminosäuren	79
3.7.2. Untersuchung des Einflusses von Glutamin auf die Protein- und RNA-Synthese der EAT-Zellen sowie auf die Hemmwirkung von ACDOC	87
3.8. Hemmbarkeit der Leucyl-tRNA-Synthetase durch ACDOC und Naphthochinon in vitro	93
3.8.1. Ergebnis	94
4. Zusammenfassung	96
5. Diskussion	98
6. Literaturverzeichnis	106



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0007

1. Einleitung

Im Rahmen der Untersuchung "Chinone als antibiotisches und zytostatisches Prinzip" (A. Ogilvie) sollten in dieser Arbeit einige synthetische Chinone in ihrer Wirkung auf die Synthese der Makromoleküle Protein und Nukleinsäuren in Eukariontenzellen getestet werden. Eine mögliche Abhängigkeit der Wirkung von der Aminosäurezusammensetzung des Mediums war von besonderem Interesse.

Die Chinonstruktur ist Bestandteil vieler natürlicher Antibiotika und Zytostatika, so z.B. von Daunomycin, Adriamycin, Mitomycin, Streptonigrin, Lapachol, Granaticin; auch werden viele synthetische Derivate von Benzochinon, Naphthochinon und anderen Chinonen auf ihre zytostatischen oder antibiotischen Eigenschaften hin untersucht. Die ersten Hinweise auf die biologische Hemmwirkung von Chinonen stammen von Wöhler (1); die bakterizide Eigenschaft von Benzochinon wurde 1911 genauer untersucht (2). Chinonderivate mit zytostatischen Eigenschaften wurden auch im klinischen Einsatz getestet: als Antimalariamittel (3,4) und als Zytostatika bei malignen Tumoren (5,6). Daunomycin (7) und vor allem Adriamycin (8) erlangten dabei größere Bedeutung.

Chinone können mit biologisch relevanten Molekülen auf viele Arten reagieren. Einige wichtige seien kurz genannt (ausführliche Angaben in 39,40,41):

Reaktion mit SH-Gruppen

Chinone oxidieren SH-Gruppen oder reagieren unter 1,4-Addition, meist ist Thiochinon das Endprodukt. Substitutionen am Chinonmolekül verändern das Reaktionsverhalten wesentlich; so scheinen Benzo- und Naphthochinone, bei denen am C-Atom neben einer der beiden Carbonylgruppen ein Halogenwasserstoff sitzt, besonders reaktiv zu sein (Beispiel ACDOC). Von Bedeutung ist die Reaktion von Chinonen mit der SH-Gruppe des Cysteins, da diese Aminosäure in Proteinen freie SH-Gruppen bildet.

Reaktion mit Aminogruppen

Alle freien Aminosäuren und die basischen Seitenketten der Proteine haben Aminogruppen, mit denen die Chinone mit 1,4-Addition wie mit SH-Gruppen reagieren; es scheinen auch weitere, bis jetzt ungeklärte Mechanismen möglich zu sein. Die quantitative Umsetzung bestimmter substituierter Chinone mit Aminosäuren zu Farbstoffen wurde auch zur Bestimmung des Aminosäuregehaltes im Serum benutzt (9,10).

Reaktion mit Proteinen

Die Bindung von Chinonen an bakterielle Proteine wurde bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts als Ursache der antibiotischen Eigenschaften vermutet (11,12). Seitdem wurden die Interaktionen Chinon-Protein häufig untersucht. Als vorläufige Schlußfolgerung gilt: je nach Bedingungen und Eigenschaften der Reaktionspartner können sich sowohl N- als auch S-chinoid-haltige Proteine bilden (13).

Komplexbildung mit Metallionen

Metallionen sind in vielen Enzymen enthalten und für deren Wirkung notwendig. Eine Komplexbildung mit diesen Ionen ist ebenfalls als Form der Chinonwirkung denkbar; die Tryptophan-Pyrrolase wird durch Chinone wahrscheinlich durch die Komplexierung des Eisens "im" Enzym gehemmt (14). Chinone können als Elektronenakzeptoren wirken, daher wird ihnen eine Rolle in physiologischen Elektronen-Transportsystemen zugeschrieben (z.B. Ubichinon der Atmungskette). Das ist somit ein möglicher Angriffspunkt bei der Hemmung des Zellstoffwechsels.

Als weitere Chinonwirkung sei noch die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung genannt, es wurde eine sogenannte Entkopplungsreaktion als Wirkungsmechanismus diskutiert (15).

Zeigt ein Chinon eine Wirkung als Hemmstoff in einem biologischen System, sind dafür also viele Wirkungsmechanismen möglich. Ob jedoch ein Molekül mit Chinonstruktur seine spezifische Wirkung durch diese Struktur oder durch andere Molekülbestandteile ausübt, muß jeweils untersucht werden.

So scheint die Naphthochinonstruktur von Rifamycin S für die in vitro-Wirkung am Zielmolekül RNA-Polymerase wenig Bedeutung zu haben (16).

Auch bei dem Indolchinon-Derivat Mitomycin wurden andere funktionelle Molekülgruppen als Ursache der antibiotischen und karzinostatischen Wirkung nachgewiesen. Mitomycin bildet sogenannte "cross-links" mit der DNA; diese Vernetzung der DNA-Moleküle wird durch die alkylierenden Eigenschaften des Aziridinringes und der Urethan-Seitenkette verursacht (17-21). Mitomycin-Derivate ohne Aziridinring und Urethan-Seitenkette zeigten aber ebenfalls eine Hemmung von Bakterien- oder Tumorzellwachstum, ohne daß sich eine Bindung an DNA nachweisen ließ (22,23,24). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß der Chinonring eine wesentliche Komponente der Hemmwirkung darstellt.

Die Arbeitsgruppe Ogilvie untersuchte daher weitere natürliche und synthetische Chinone auf ihre bakteriostatischen Eigenschaften und den zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus (25,27,33), vor allem Granaticin aus *Streptomyces olivaceus* und das synthetische Chinon 6-Amino-7-chlor-5,8-dioxochinolin (ACDOC) (26-33). Entscheidend für die Aufklärung des Wirkungsmechanismus war die Beobachtung, daß die bakteriostatische Wirkung von Granaticin an *Bacillus subtilis* und von ACDOC an *E. coli* abhängig ist von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums. Die Zugabe von Aminosäuren reduzierte die Hemmwirkung oder hob sie völlig auf; die Austestung der einzelnen Aminosäuren zeigte, daß Leucin der entscheidende Effekt zukam. Leucinzugabe zum Medium allein kann die Hemmwirkung niedriger Konzentrationen von Granaticin oder ACDOC aufheben. Letztendlich konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der Leucyl-tRNA-Synthetase durch Granaticin oder ACDOC der Grund der Hemmung der Protein- und Nukleinsäuresynthese ist. Wegen der zytostatischen Eigenschaft vieler Moleküle mit Chinonstruktur wurden die Untersuchungen mit synthetischen Chinonen auf Eukaryonten ausgedehnt. Als Zellmaterial bietet sich hierzu der Ehrlich-Ascites-Tumor der Maus an wegen

der einfachen Zellzüchtung in der Maus und der ausreichenden Stabilität der Zellen bei der Präparation (weiteres siehe 2.3.).

ACDOC hemmt in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (EAT-Zellen) zunächst nur die Proteinsynthese, zur zusätzlichen Hemmung der RNA- und DNA-Synthese sind höhere Konzentrationen oder längere Einwirkungszeit nötig. ACDOC scheint in den Tumorzellen zu akkumulieren; seine Hemmwirkung ist nicht "abwaschbar", also irreversibel. Durch ACDOC-Konzentrationen über 5 µg/ml werden die EAT-Zellen in vitro abgetötet. Ähnlich wie bei Bakterien verringert die Zugabe der essentiellen Aminosäuren im Überschuß die ACDOC-Wirkung (34). Ob dabei eine Aminosäure des Gemisches für die Hemmungsabschwächung von besonderer Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit untersucht. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß ACDOC in einem EAT-Zellenextrakt das Enzym Leucyl-tRNA-Synthetase inaktiviert (35).

In dieser Arbeit sollten weitere Chinone mit chemisch einfacher Struktur daraufhin untersucht werden, ob auch sie bei EAT-Zellen die Protein- und Nukleinsäure-Synthese beeinflussen können. Im folgenden werden sie kurz "vorgestellt" und die Gründe für die Wahl angegeben.

6-Amino-5,8-dioxo-7-thiomethyl-chinolin ("3105") unterscheidet sich von ACDOC nur durch die Thiomethylgruppe an C₇ (statt Chlor). Wenn die Chinonstruktur das wirksame Prinzip ist, sollte der Effekt von 3105 auf EAT-Zellen dem von ACDOC gleichkommen.

p-Benzochinon ist die nackte Grundstruktur der Chinone, seine Untersuchung als "reines Chinon" drängte sich daher auf; es ist gut wasserlöslich. Die häufige Verwendung als Redoxsystem und bei der photochemischen Entwicklung ist ein Hinweis auf seine chemische Aktivität.

Ebenfalls wegen des chemisch einfachen Aufbaues wurde 1,4-Naphthochinon gewählt. Außerdem bildet es die Ausgangssubstanz bei der Suche nach Antimalariamitteln, die in den Plasmodien durch einen antagonistischen Effekt zu Coenzym Q

wirken sollen, was allerdings noch nicht bestätigt werden konnte (3,4). In einem in-vitro-System sollte untersucht werden, ob Naphthochinon die Leucyl-tRNA-Synthetase aus EAT-Zellen hemmen kann.

2-Methylnaphthochinon (Menadion) wird auch als Vitamin K₃ bezeichnet, da es die Grundstruktur der K-Vitamine bildet, die sich durch unterschiedliche Seitenketten an C₃ unterscheiden. Untersuchungen für Strukturwirkungsbeziehungen ergaben, daß der wirksame Bestandteil der natürlichen K-Vitamine das 2-Methyl-1,4-naphthochinon ist. Fehlt die Methylgruppe an C₂ oder ist sie durch eine längere Kette ersetzt, ist die Verbindung unwirksam (36). Menadion besitzt die gleiche Wirksamkeit wie die natürlichen Vitamine (37). Die Funktion der K-Vitamine im Zellstoffwechsel ist bis heute nicht geklärt.

Für Menadion und 3105 wurde bei E.coli ein ähnliches Verhalten gefunden wie für Granaticin bei B.subtilis, sie greifen ebenfalls in den Leucin-tRNA-Umsatz ein (38). 5-Chlor-8-hydroxy-chinolin ist kein Chinon. Wegen des Chinolingerüsts, einer OH-Gruppe an C₈ (statt Carbonylgruppe) und einem elektronegativen Atom an C₅ (Chlor) wurde es als ähnlich gebautes Molekül den untersuchten Chinonen gegenübergestellt. Wenn die Wirkung von Chlorhydroxychinolin und Chinonen auf EAT-Zellen gleich ist, spräche dies gegen eine spezifische Chinonwirkung.

8-Hydroxychinolin und halogenierte Derivate werden als lokale Desinfektionsmittel und bei Durchfallerkrankungen eingesetzt. 5-Chlor-8-hydroxychinolin selbst ist als Antimykotikum Bestandteil des Hauttherapeutikums Decoderm^R trivalent Creme.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen von ACDOC und anderen Chinonen an Bakterien und ACDOC an EAT-Zellen sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen an EAT-Zellen bearbeitet werden:

1. Sind die bei ACDOC beobachteten Hemmeffekte typisch auch für andere Chinone und Chinoline?

Die Wirkung der Hemmstoffe auf die RNA-, DNA- und Proteinsynthese, gemessen am Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen in säurefällbares Material, soll geprüft werden in Abhängigkeit von den zugesetzten Konzentrationen sowie die Verminderung oder Aufhebung der Wirkung durch Zusatz von Aminosäuren.

2. Kann eine einzelne Aminosäure im Inkubationsmedium die Wirkung von ACDOC vermindern oder aufheben?

3. Hemmt ein anderes Chinon ebenso wie ACDOC die Aminoacylierung von tRNA in vitro?

2. Material und Methoden

2.1. Hemmstoffe

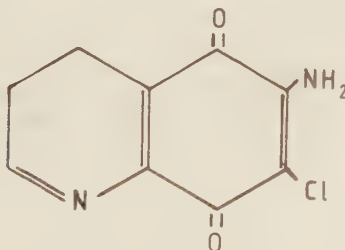
2.1.1. ACDOC

Das synthetische Chinon 6-Amino-7-chlor-5,8-dioxochinolin (ACDOC) wurde von Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestellt. Es ist ein ziegelrotes Pulver, das schlecht wasserlöslich ist. Bei den Einbauversuchen wurde eine gesättigte wäßrige Lösung verwendet (Herstellung nach 2.1.7.), deren Hemmaktivität über mehrere Wochen unverändert blieb; Konzentrationsbestimmung siehe Dissertation Wiebauer (31).

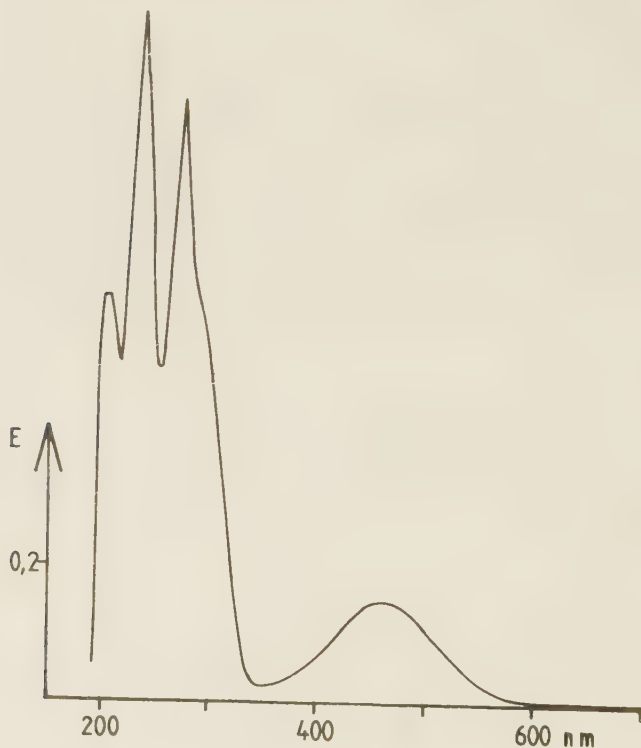
ACDOC: MG 208,6

Konzentration gesättigte wäßrige Lösung $50 \mu\text{g/ml} = 240 \mu\text{M}$
molarer Extinktionskoeffizient bei $450 \text{ nm} = 3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Strukturformel:



Absorptionsspektrum der gesättigten wäßrigen Lösung
von ACDOC, verdünnt 1 : 6 mit aqua bidest



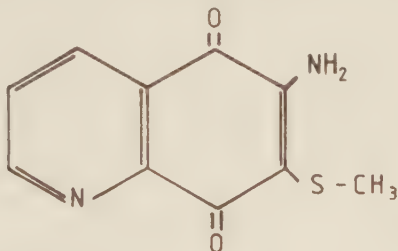
2.1.2. 3105

Die Substanz 6-Amino-5,8-dioxo-7-thiomethylchinolin (Bezeichnung "3105") wurde ebenfalls von Bayer, Leverkusen synthetisiert. Es ist ein dunkelrotbraunes Pulver, von dem eine gesättigte wäßrige Lösung eingesetzt wurde (siehe 2.1.7.).

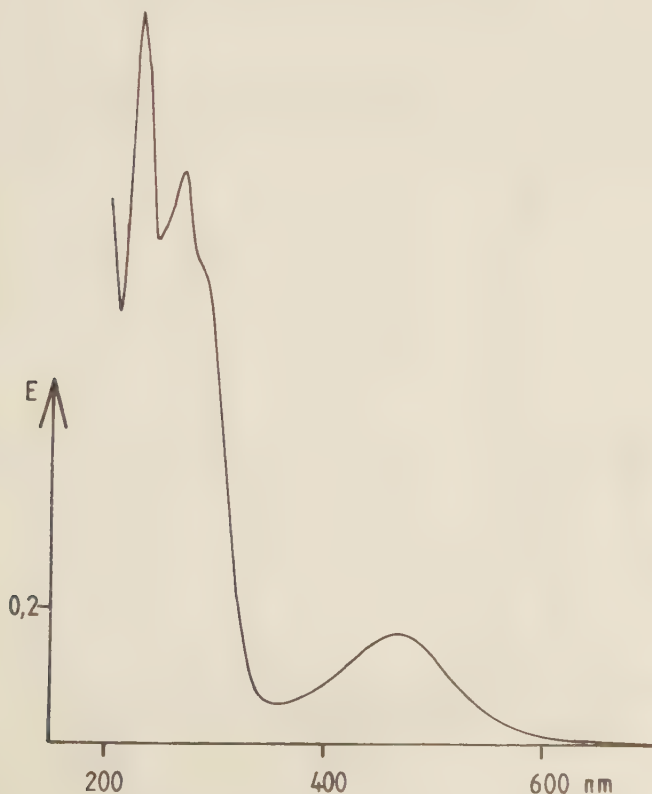
3105: MG 220

Konzentration gesättigte wäßrige Lösung $140 \mu\text{g/ml} = 640 \mu\text{M}$
molarer Extinktionskoeffizient bei 468 nm $2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Strukturformel:



Absorptionsspektrum der gesättigten wäßrigen Lösung von
3105, verdünnt 1 : 10 mit aqua bidest



2.1.3. p-Benzochinon

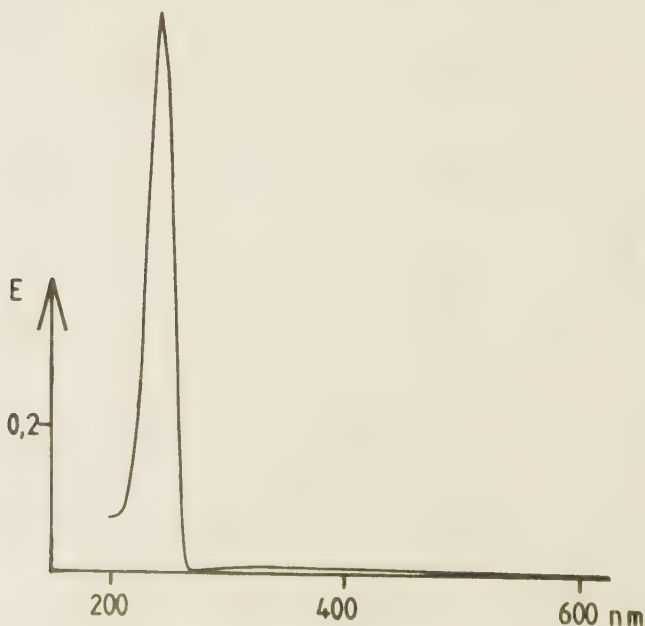
p-Benzochinon bildet gelb-grüne Kristalle und ist ausreichend wasserlöslich: 1,4 g in 100 ml Wasser bei 24°C (42). Es wurde eine Lösung von 200 µg/ml entsprechend 1,85 mM benutzt.

Molekulargewicht: 108

Strukturformel:



Absorptionsspektrum einer wäßrigen Lösung von Benzoquinon
4 µg/ml



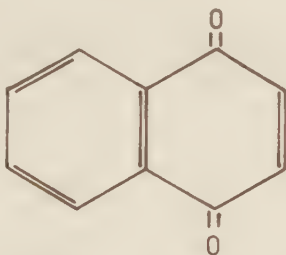
2.1.4. 1,4-Naphthochinon

Es bildet grüne Kristallnadeln, die sich in Wasser nur sehr gering lösen. Es wurde eine gesättigte wäßrige Lösung benutzt (2.1.7.).

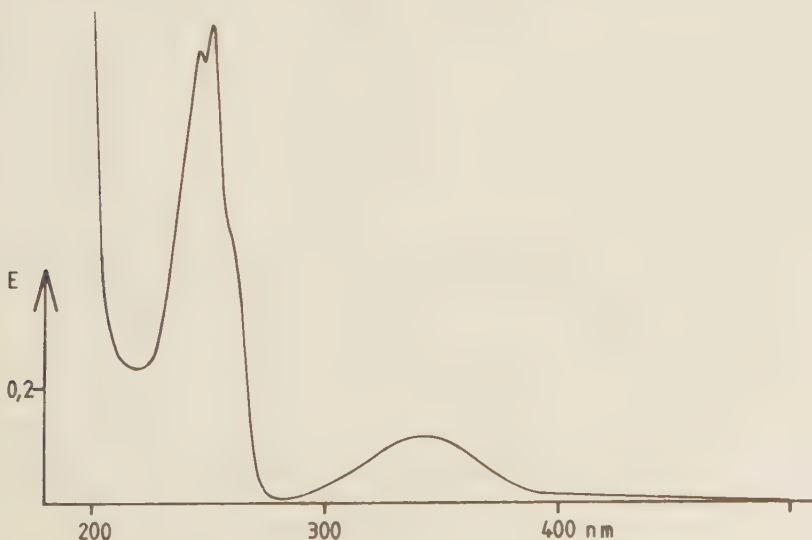
Naphthochinon-1,4: MG 158

Konzentration gesättigte wäßrige Lösung: $140 \mu\text{g/ml} = 800 \mu\text{M}$
molarer Extinktionskoeffizient bei $340 \text{ nm} = 3,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Strukturformel:



Absorptionsspektrum der gesättigten wäßrigen Lösung von
1,4-Naphthochinon, verdünnt 1 : 30 mit aqua bidest



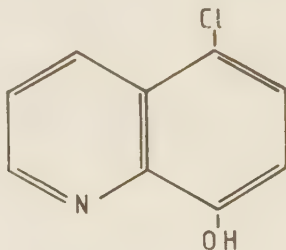
2.1.5. Chlorhydroxychinolin (CHC)

5-Chlor-8-hydroxychinolin (Abkürzung CHC) wurde von Riedel - De Haen (Seelze-Hannover) bezogen. Die weißen Kristallnadeln bilden eine Struktur wie feine Baumwollflocken. Dem Inkubationsmedium wurde es zugegeben als Suspension in aqua bidest. mit Konzentrationen von 0,5 mg/ml = 2,8 mM und 1,5 mg/ml = 8,4 mM. Zur Bestimmung des gelösten Anteilles wurde nach 2.1.7. und 2.1.8. verfahren.

CHC: MG 179,5

Konzentration gesättigte wäßrige Lösung 9,8 µg/ml = 55 µM
molarer Extinktionskoeffizient bei 340 nm = $3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Strukturformel:



Absorptionsspektrum der gesättigten wäßrigen CHC-Lösung,
verdünnt 1 : 2 mit aqua bidest



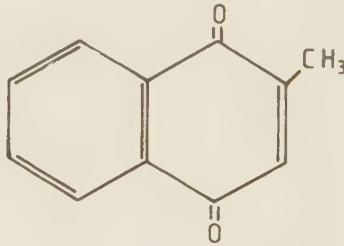
2.1.6. Menadion

2-Methyl-1,4-naphthochinon, auch als Menadion oder Vitamin K₃ bezeichnet, liegt als gelbes kristallines Pulver vor. Bei den Einbauversuchen wurde eine gesättigte wäßrige Lösung benutzt.

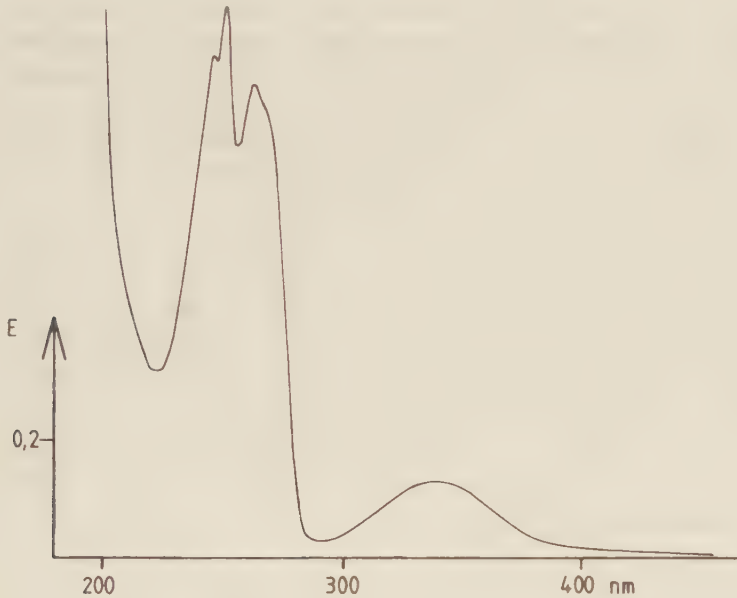
Menadion: MG 172

Konzentration gesättigte wäßrige Lösung $62 \mu\text{g/ml} = 360 \mu\text{M}$
molarer Extinktionskoeffizient bei $340 \text{ nm} = 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Strukturformel:



Absorptionsspektrum der gesättigten wäßrigen Menadionlösung, verdünnt 1 : 10 mit aqua bidest



2.1.7. Herstellung der Hemmstofflösungen

Da nur Benzochinon gut wasserlöslich ist, wurden von den anderen Chinonen gesättigte wäßrige Lösungen hergestellt: mit aqua bidest wurden Suspensionen von 200 µg/ml angesetzt, mittels Magnetrührer für mehrere Stunden gerührt, bei 2300 g über 1 h zentrifugiert und der Überstand durch Nitrozellulosefilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Die Lösungen wurden bei + 4° C im Dunkeln aufbewahrt und bei Bedarf dem Inkubationsansatz zugesetzt. Chlorhydroxychinolin wurde als Suspension von 0,5 mg/ml und 1,5 mg/ml eingesetzt.

2.1.8. Konzentrationsbestimmung der Hemmstofflösungen

Als einfachste Meßmethode bietet sich die Photometrie an. Da aber eine wäßrige Lösung bekannter Konzentration als Meßstandard bzw. zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten ϵ nicht hergestellt werden kann wegen der unbekannten und sicher äußerst geringen Löslichkeit, wurde die gesättigte wäßrige Lösung mit einem organischen Lösungsmittel ausgeschüttelt, wobei die lipophilen Hemmstoffe in die lipophile Phase übergehen. Genaugenommen stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht zwischen polarer und apolarer Phase ein, daher muß nach dem Ausschütteln auch in der wäßrigen Phase die Absorption des Hemmstoffes gemessen werden. Die Konzentration des Hemmstoffes in der apolaren = organischen Phase kann durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration bestimmt werden, da sich die Hemmstoffe in organischen Lösungsmitteln gut lösen. Die Konzentration der gesättigten wäßrigen Lösung errechnet sich dann wie folgt:

$$C_{GW} = \frac{E_{GW}}{(E_{GW} - E_{AW})} \cdot C_{OP}$$

Dabei ist:

C_{GW} : Konzentration der gesättigten wäßrigen Lösung

E_{GW} : Extinktion der gesättigten wäßrigen Lösung

C_{OP} : Konzentration der organischen Phase nach Ausschütteln

E_{AW} : Extinktion der wäßrigen Phase nach Ausschütteln

Die Formel gilt nur, wenn gleiche Volumina der wäßrigen und organischen Phase verwandt werden.

Als organisches Lösungsmittel wurde destilliertes Chloroform mit 1 % Methanol verwendet. Damit wurden Hemmstofflösungen von 0,2 mg/ml angesetzt und Absorptionsspektren geschrieben. Zur Extinktionsmessung diente das Maximum mit der größten Lichtwellenlänge. Je 2 ml der gesättigten wäßrigen Lösung und von reinem Chloroform wurden in einem Reagenzröhrchen

geschüttelt, zur Trennung der Phasen für 3 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und die Absorption der wäßrigen und der Chloroform-Phase gemessen.

Zusammenstellung der Meßergebnisse der untersuchten Substanzen

Hemmstoff	Konzentr. der gesättigten wässrigen Lösung	molarer Extinktionskoeffizient bei ... nm	
ACDOC	50 µg/ml = 240 µM	$3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	450 nm
3105	140 µg/ml = 640 µM	$2,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	468 nm
1,4-Naphthochinon	140 µg/ml = 800 µM	$3,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	340 nm
CHC	9,8 µg/ml = 55 µM	$3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	340 nm
Menadion	62 µg/ml = 360 µM	$3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	340 nm

2.2. Puffer und Lösungen

2.2.1. Radioaktiv markierte Substanzen

Diese wurden von Radiochemical Centre, Amersham, bezogen in folgenden Aktivitäten:

	Code-Nr.	Spez. Radioaktivität	Radioaktivitätsmenge
^{14}C -Phenylalanin	CFB 70	522 mCi/mmol	50 µCi/ml
$5\text{-}^3\text{H}$ -Uridin	TRK 178	29 Ci/mmol	1 mCi/ml
methyl- ^3H -Thymidin	TRK 418	50 Ci/mmol	1 mCi/ml
^{14}C -Leucin	CFB 67	348 mCi/mmol	50 µCi/ml

Die radioaktiv markierten Substanzen wurden mit unmarkierten verdünnt und folgende Stammlösungen hergestellt, die jeweils dem Inkubationspuffer zugesetzt wurden:

^{14}C -Phe-Lösung I

^{14}C -Phe CFB 70	50	μl
Phe 4 g/l	300	μl
H_2O	1150	μl
Gesamtkonzentration Phe:	4,85	mM
spezifische Radioaktivität:	0,344	Ci/mol

^{14}C -Phe-Lösung II

^{14}C -Phe CFB 70	50	μl
Phe 2 g/l	300	μl
H_2O	400	μl
Gesamtkonzentration Phe:	4,85	mM
spezifische Radioaktivität:	0,686	Ci/mol

^{14}C -Phe-Lösung III (verwendet bei den Zellinkubationen des Teiles 3.7.)

^{14}C -Phe CFB 70	50	μl
Phe 4 g/l	150	μl
H_2O	400	μl
Gesamtkonzentration Phe:	6,06	mM
spezifische Radioaktivität:	0,687	Ci/mol

^3H -Uridin-Stammlösung

5- ^3H -Uridin TRK 178	200	μl
Uridin 4 g/l	300	μl
H_2O	1000	μl
Gesamtkonzentration Uridin:	3,28	mM
spezifische Radioaktivität:	40,5	Ci/mol

^3H -Thymidin-Stammlösung

methyl- ^3H -Thymidin TRK 418	300	μl
Thymidin 1 g/l	100	μl
H_2O	1100	μl
Gesamtkonzentration Thymidin:	0,8	mM
spezifische Radioaktivität	250	Ci/mol

2.2.2. Puffer

Zum Waschen der Tumorzellen wurde PBS verwendet; PBS = Phosphate Buffered Saline (n. Dulbecco, (43a)).

NaCl	8,0 g/l
KCl	0,20 g/l
Na_2HPO_4	1,15 g/l
KH_2PO_4	0,20 g/l

In der Originalangabe enthält der Puffer noch CaCl_2 0,10 g/l und $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,10 g/l, diese wurden aber weggelassen, um beim Waschen der aus der Maus frisch geernteten Ascites-Suspension die Verklumpung der Zellen

durch Fibrinbildung nicht zu begünstigen (siehe auch 3.1.1.).

Balanced Salt Solution

	nach Hank = "HBSS" (43b)	nach Earle = "EBSS" (43c)
NaCl	8,0 g	6,80 g
KCl	0,40 g	0,40 g
CaCl ₂ (anhydr.)	0,14 g	0,20 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g	0,20 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10 g	-
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,06 g	-
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	-	0,14 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g	-
NaHCO ₃	0,35 g	2,20 g
Glucose (Monohydrat)	1,0 g	1,0 g

ad 1 l

Die Puffer wurden selbst angesetzt und mit NaOH oder HCl auf pH 7,40 eingestellt.

2.2.3. Aminosäuregemisch

Für die Inkubation der EAT-Zellen im aminosäurehaltigen Medium wurde folgende Aminosäurenstammlösung angesetzt und bei Bedarf dem Inkubationspuffer zupipettiert (Aminosäuremuster wie "Eagle's Minimum Essential Medium" (44), Konzentration verändert):

Aminosäure	ml der 10^{-1} M Lösungen	Konzentr. im Aminos.-Gemisch	Konzentr. im Inkubat.-Medium
L-Arg	2	4×10^{-3} M	$1,74 \times 10^{-4}$ M
L-Cys-Cys	1	2×10^{-3} M	$0,87 \times 10^{-4}$ M
L-Glu-NH ₂	5	1×10^{-2} M	$4,35 \times 10^{-4}$ M
L-His	1	2×10^{-3} M	$0,87 \times 10^{-4}$ M
L-Ile	2	4×10^{-3} M	$1,74 \times 10^{-4}$ M
L-Leu	2	4×10^{-3} M	$1,74 \times 10^{-4}$ M
L-Lys	2	4×10^{-3} M	$1,74 \times 10^{-4}$ M
L-Meth	0,5	1×10^{-3} M	$4,35 \times 10^{-5}$ M
L-Thr	2	4×10^{-3} M	$1,74 \times 10^{-4}$ M
L-Trp	0,1	2×10^{-4} M	$0,87 \times 10^{-5}$ M
L-Tyr	2	4×10^{-3} M	$1,74 \times 10^{-4}$ M
L-Val	2	4×10^{-3} M	$1,74 \times 10^{-4}$ M

aqua bidest. ad 50 ml

Gesamtkonzentration aller Aminosäuren:	$43,2 \times 10^{-3}$ M	$1,88 \times 10^{-3}$ M
---	-------------------------	-------------------------

L-Phe war mit $8,43 \times 10^{-6}$ M (bzw. $10,54 \times 10^{-6}$ M) stets im Inkubationsmedium enthalten durch Zugabe der ^{14}C -Phe-Einbaulösung I (bzw. III) (siehe 2.1.2.).

Das Gemisch enthält Cystin und nicht Cystein, da letztere Aminosäure mit ihrer freien SH-Gruppe mit Chinonen im Medium reagieren könnte.

2.2.4. Szintillationsflüssigkeit

Zum Nachweis der radioaktiven Zerfälle diente folgende Toluol-Lösung:

2,5-Diphenyloxazol (PPO) 5,0 g

1,4-Di-(2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl))-
-benzol (POPOP) 0,3 g

in 1 l Toluol.

PPO und POPOP wurden von Zinsser, Frankfurt bezogen.

Trichloressigsäure (TCA)

Die Prozentangaben der Konzentrationen sind als Gewicht pro Volumen zu verstehen (w/v), z.B. wurde eine 50 % TCA-Lösung hergestellt durch Lösen von 1 kg TCA in 2 l dest. Wasser.

2.2.5. Weiteres Material und Geräte

Beim Abfiltrieren des säurefällbaren Materials (siehe 2.5.2.) wurden Nitrocellulose-Filter BA 85 von Schleicher und Schüll (Porengröße 0,45 μ m, Durchmesser 25 mm), beim Ausfällen der beladenen tRNA (siehe 3.8.) Papierfilter Nr. 598 (d = 23 mm) von Schleicher und Schütt verwendet.

Es wurden u.a. folgende Geräte benutzt:

Zentrifuge "Mistral 6 L" von MSE

Photometer: Beckmann Modell 25

Shimadzu UV 210 A

Flüssigkeitsszintillationszähler: Modell 3385 von

Packard Instrument Company

automatische Pipetten: Fa. Eppendorf

2.3. Zellmaterial

Die Zellen dieser Versuchsreihe sind Ehrlich-Lettré-Ascites-Tumorzellen (in dieser Arbeit meist abgekürzt als EAT-Zellen).

Ehrlich und Apolant fanden 1905 ein solides Mammacarcinom der Maus, das transplantiert werden konnte; Löwenthal und Jahn überführten diesen Tumor in die Ascitesform im Jahre 1932, Lettré führte die Arbeiten weiter.

Es gibt mehrere Unterlinien, die sich u.a. in der Anzahl der Chromosomen unterscheiden (45).

Bringt man EAT-Zellen in die freie Bauchhöhle einer Maus, so regen sie die Bildung von reichlich Ascites an, indem sich die Zellen in suspendierter Form vermehren. Da die "infizierten" Tiere nach etwa 2 Wochen an den Folgen des Tumorstwachstums sterben, wird zur Erhaltung des Zellstammes der Ascites einer Maus entnommen und in gesunde Tiere injiziert. Die in vitro-Kultur ist ebenfalls möglich.

Der verwendete Zellstamm wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Fr. Schneider, Marburg/Lahn, zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wächst in vitro als Suspension und nicht als einschichtige Zelllage (monolayer) und ist dadurch einfacher zu handhaben.

2.4. Zellzüchtung und Präparation

2.4.1. Vermehrung in der Maus

a) Haltung der Mäuse

Als Trägartiere dienten weibliche Albinomäuse NMR I, 20-25 g schwer, der Fa. S. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu. Sie wurden in einem Tierstall unter normalen Umweltbedingungen gehalten zu durchschnittlich 10 Tieren in Plastikkäfigen und mit Trockenpressfutter (Altromin^R) und Wasser

ernährt.

Die Tiere wurden durch Farbmarkierung mit wässriger Pikrinsäurelösung auf dem Rückenfell markiert, um durch tägliches Wiegen die Gewichtszunahme durch die Ascitesbildung zu verfolgen.

b) Impfen der Mäuse (Weiterzucht der EAT-Zellen)

Zum Überimpfen wurde der Ascites meist am 7. Tag nach Inokulation entnommen, selten auch zwischen den 4. und 10. Tagen.

Um den Ascites zu gewinnen, für Einbauversuche oder zum Überimpfen, wurde die Maus durch Cervikaldislokation getötet. Danach wurde das Tier mit Stecknadeln durch Vorder- und Hinterpfoten auf einer geeigneten Unterlage fixiert und das Bauchfell mit einer Pinzette angehoben, mit einer Schere eingeschnitten und mit einer weiteren Pinzette nach oben und unten auseinandergezogen. Dabei darf die Bauchmuskelschicht nicht verletzt werden, um ein Auslaufen des Ascites zu verhindern.

Mit einer Spritze und einer Kanüle (Nr. 1) saugt man die Zellsuspension aus der Bauchhöhle ab, indem man durch die dünne und transparente Bauchmuskulatur eingeht und langsam aspiriert, am besten jeweils auf der linken und rechten Seite. Saugt sich eine Darmschlinge an der Nadelspitze fest, spritzt man eine kleine Flüssigkeitsmenge wieder zurück und führt die Nadel an eine andere Stelle, oder man sticht nochmals neu ein.

Der gewonnene Ascites mit den darin suspendierten EAT-Zellen wird sofort zum Überimpfen verwendet.

Eine gesunde Maus wird mit Daumen und Zeigefinger im Nacken gehalten und dabei das Fell gespannt, um die Beweglichkeit des Kopfes einzuschränken, der Schwanz wird zwischen Daumenballen und den übrigen Fingern eingeklemmt und das Tier gestreckt gehalten. Nach Desinfektion des Bauchfelles mit einem gebräuchlichen Tupfer werden 0,2 ml Ascites in die Bauchhöhle injiziert (entsprechend 5×10^7 EAT-Zellen). Dazu verwendet man eventuell eine Insulinspritze und dünne

Kanülen (Nr. 18). Die Kanüle wird etwas medial des Hinterbeinansatzes eingestochen und nicht zu flach (subkutane Injektion!) und nicht zu weit (Leber, Uterus) schräg zur Mitte vorgeführt. Da die Darmwand reflektorisch zurückweicht, sind Darmverletzungen nicht zu befürchten und auch nicht beobachtet worden.

Während des Impfens trägt man am besten Handschuhe, da die Mäuse als Schreckreaktion oft Blase und Darm entleeren.

Wird das Tier ausreichend fest und gespannt gehalten, kann es nicht beißen.

2.4.2. Bestimmung der Zellmenge

a) mittels Zählkammer

Mit Hilfe der Zählkammer kann nicht nur direkt die Zellzahl bestimmt werden, sondern auch bei geeigneter Färbung der Anteil der toten Zellen. Auch ist eine mikroskopische Beurteilung des Zellmaterials möglich.

Es wurde eine Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal verwendet.

Um die einzelnen Zellen gut unterscheiden zu können, sollte die Zellkonzentration in der zu zählenden Suspension nicht größer als 10^6 Zellen/ml sein.

b) mittels Photometrie

Einfacher und schneller läßt sich die Zellmenge durch Extinktionsmessung bestimmen. Für eine in vitro wachsende Zellkultur gilt: wenn bei den zu vergleichenden Zellsuspensionen mittleres Zellvolumen und mittlerer Zelldurchmesser etwa gleich sind, kann man nach Aufstellen einer Eichkurve die Zellzahl bzw. Konzentration der jeweiligen Suspension messen (51). Diese Voraussetzungen wurden bei frisch geernteten EAT-Zellen als gegeben betrachtet.

Da die Extinktion der Asciteszellsuspension in einem Konzentrationsbereich bis $0,5 \text{ OD/ml} = 0,85 \times 10^6 \text{ Zellen/ml}$

linear zur Zellzahl ist, kann zur Bestimmung der Zellkonzentration die Extinktion einer verdünnten Zellsuspension gemessen werden. Das ist in einem Wellenlängenbereich von 500 nm bis 650 nm möglich, hier wurde Licht mit 578 nm (Hg-Filter) verwendet. Im folgenden wird die Zellmenge bzw. die Zellkonzentration in OD bzw. OD/ml angegeben; OD gleich optische Dichte. 1 OD₅₇₈ ist die Zellmenge, die in 1 ml gelöst bei 578 nm und der Schichtdicke 1 cm die Extinktion 1 hat, das entspricht $1,7 \times 10^6$ Zellen.

2.4.3. Fremd- und Totzellen

In der Suspension der EAT-Zellen sind auch Zellen der Maus enthalten (Peritonealendothelzellen, Leukozyten), die in der Zählkammer nur schwer als Fremdzellen erkannt werden können. Mit geeigneten Färbungen lassen sie sich darstellen und zählen. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl liegt bei 10 % und ist relativ konstant (46).

Sie wurden daher nicht weiter berücksichtigt. Aufwendige Trennungsverfahren zur Beseitigung der Fremdzellen wurden nicht durchgeführt.

Als "tot" oder irreversibel geschädigt gilt eine Zelle, die mit Trypanblau anfärbbar ist. Bei gesunden oder reversibel geschädigten Zellen verhindert die intakte Membranfunktion das Eindringen des Farbstoffes in die Zelle. Dieser "dye exclusion test" liefert brauchbare Ergebnisse (47). In der frischen EAT-Zellsuspension wurden nicht mehr als 5 % Totzellen gefunden, daher wurde deren Zahl nicht immer bestimmt und blieb im weiteren unberücksichtigt.

Von einer 1 % Trypanblau-Lösung in PBS gibt man 10 µl zu 100 µl Zellsuspension, schüttelt, inkubiert für 3 Minuten bei 20° C und kann dann die "Totzellen" in der Zählkammer zählen.

2.4.4. Präparation der EAT-Zellen

Nach einer Injektion von ca. 10^7 Zellen in die freie Bauchhöhle der Maus wachsen die EAT-Zellen vom 2. bis 6. Tag nach der Überimpfung in der logarithmischen Phase, danach tritt Verlangsamung und Stillstand der Zellvermehrung ein (55). Für die vorliegenden Versuche wurde der Ascites am 4. oder 5. Tag entnommen. Die Zellen sind dann noch in der logarithmischen Wachstumsphase; es wurde aber auch schon genügend Ascites gebildet (zwischen 1 und 3 ml), der leicht aus der Maus zu entnehmen ist.

Manchmal wurden auch EAT-Zellen aus 2 Mäusen entnommen und gemischt. Die Zellkonzentration im Ascites liegt bei $2 - 3 \times 10^8$ Zellen/ml (am 5. - 7. Tag). Unmittelbar nach der Entnahme aus der Maus wird der Ascites in 100 ml eiskalten PBS-Puffer aufgeschwemmt und durch 5 Lagen Verbandmull filtriert. Dadurch sollen größere Zellklumpen und Fibringerinnsel entfernt werden. Von der Suspension werden nun 100 μ l entnommen, mit 900 μ l PBS verdünnt, die Extinktion bei 578 nm gemessen und die Zellmenge bestimmt: $OD = E_{578} \times 10 \times \text{Suspensionsvolumen}$.

Die Zellsuspension wird für 7,5 Minuten bei 260 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dadurch sollen die Zellen von den übrigen Ascites-Bestandteilen getrennt werden, vor allem von freiem Eiweiß.

Nach der 2. Zentrifugation wird das Pellet in HBSS oder EBSS aufgenommen; die Zellkonzentration soll 10 OD/ml betragen. Bei der ersten Messung wurde die geerntete Zellmenge bestimmt.

Da beim Waschen Zellen verloren gehen und die erste Messung auch durch Eiweiß und anderes verfälscht wird, berechnet man die benötigte Puffermenge zunächst auf 16 OD/ml. Mit Hilfe dieses Erfahrungswertes erhält man recht genau die Puffermenge, in der das Pellet gelöst eine Zellkonzentration von $10 \text{ OD/ml} = 1,7 \times 10^6$ Zellen ergibt. Nach dem Sus-

pendieren wird die Zellkonzentration überprüft:
50 μ l Suspension werden mit 4,95 ml Puffer verdünnt und
die Extinktion gemessen.

Arbeitsschema der Zellpräparation

x ml Ascites aus der Maus in 100 ml PBS (eiskalt) aufschwemmen

durch 5-lagigen Verbandmull filtern

Messen des Suspensionsvolumens

Bestimmung der Zellmenge

100 μ l + 900 μ l PBS, Extinktionsmessung bei 578 nm,
Zellernte $OD = E_{578} \times 10 \times \text{Suspensionsvolumen}$

Zentrifugieren in Mistral 6 L bei 1000 U/min

= 260 xg für 7,5 Min. bei 4° C

Überstand verwerfen, Pellet suspendieren in 100 ml PBS
(eiskalt)

Zentrifugieren wie oben

Pellet in HBSS oder EBSS suspendieren, so daß Zellkonzentration 10 OD/ml

Messen der Zellkonzentration durch Extinktionsmessung

50 μ l + 4950 μ l Puffer,
 $OD/ml = E_{578} \times 100 \times 1/ml$

Zellsuspension bis zum Inkubationsbeginn in Eis stellen.

2.5. Markierung der Zellen mit radioaktiven Vorstufen

2.5.1. Prinzip

Bietet man den Zellen im Medium Aminosäuren oder Nukleoside an, werden diese aufgenommen und in die entsprechenden Makromoleküle der Zelle eingebaut. Ihr Einbau pro Zeiteinheit ist ein Maß für Nettosynthese dieser Makromoleküle. Ist in den Vorstufen jeweils ein bestimmtes Atom durch sein radioaktives Isotop ersetzt, z.B. ^3H oder ^{14}C , kann der Anteil dieser Vorstufen in den Makromolekülen bestimmt werden durch Messung der radioaktiven Zerfälle pro Zeit (= dpm). Da nach Aufschluß der Zellen die Makromoleküle Protein und Nukleinsäuren durch Säure (TCA) gefällt werden können, ist die Radioaktivität des säurefällbaren Materials ein Maß für die Nettosynthese von Protein und Nukleinsäuren. Die nicht eingebauten Vorläufermoleküle (Aminosäuren oder Nukleoside) sind nicht durch TCA fällbar.

Bei diesen Versuchen wurde zur Markierung der Proteine ^{14}C -Phenylalanin verwandt. Als Vorstufe für die RNA wurde Uridin eingesetzt, dessen H-Atom am C-Atom 5 durch das Tritium-Atom ^3H ersetzt war. Wird im Rahmen des zellulären Stoffwechsels das aufgenommene Uridin durch Methylierung an C-5 zu Thymidin umgewandelt, ist das entstehende Thymidin nicht markiert, und in die DNA wird keine Radioaktivität eingebaut (48).

Für die Messung der DNA-Synthese wurde Thymidin eingesetzt, das fast nur in DNA eingebaut wird. Das Thymidin war tritiummarkiert am Methylrest. Durch Abspaltung der Methylgruppe kann aus Thymidin Uridin entstehen, das in RNA eingebaut wird. Wegen der Stellung des markierten H-Atoms am Methylrest ist das Uridin aber nicht radioaktiv, und sein Einbau in RNA verursacht keinen Fehler.

Es wurde meistens die Technik der Doppelmarkierung angewendet, d.h., 2 verschiedene radioaktive Isotope (^3H und ^{14}C) waren gleichzeitig in jedem Ansatz. Beide Isotope sind β -Strahler, allerdings haben die vom Tritium

emittierten Elektronen eine geringere Energie als die des Kohlenstoffs ^{14}C . Das führt zu einer unterschiedlichen Intensität des vom Szintillator abgegebenen Lichtes; dadurch kann das Meßgerät das Zerfallsereignis dem ^3H - oder ^{14}C -Wert "zuordnen".

2.5.2. Durchführung

Das Inkubationsmedium der Einbauversuche hatte folgende Zusammensetzung:

HBSS oder EBSS	10,0	ml
Aminosäuregemisch nach 2.2.3.	500	µl
oder aqua bidest.	500	µl
^{14}C -Phe-Stammlösung nach 2.2.1.	10	µl
^3H -Uridin-Stammlösung nach 2.2.1.	10	µl
oder ^3H -Thymidin-Stammlösung nach 2.2.1.	10	µl
Hemmstoff-Lösung	n	µl
aqua bidest.	ad 11,0	ml

Damit wird ein 25 ml-Erlenmeyerkolben gefüllt und verschlossen in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Die EAT-Zellen werden nach 2.4.4. vorbereitet.

Als Versuchsbeginn gilt der Zeitpunkt der Zugabe der Zellen zum Inkubationspuffer. 500 µl der Zellsuspension 10 OD/ml werden je Ansatz zugegeben, der Erlenmeyerkolben kurz geschwenkt zum Mischen und wieder in das Wasserbad gestellt. Um den zeitlichen Verlauf des Einbaues zu verfolgen, werden innerhalb 2 bis 3 Stunden nach Versuchsbeginn, je nach Versuchsaufbau, 10 Proben zu je 1 ml des Inkubationsmediums entnommen.

Würden alle diese Proben direkt aus dem Erlenmeyerkolben

entnommen werden, müßte das Gefäß jeweils kurz geschüttelt werden und geöffnet werden. Dabei könnten die Zellen irritiert werden und das Gas über dem Inkubationsmedium würde sich ändern, wodurch das pH des mit Bicarbonat gepufferten EBSS sich ändert. Um dies zu vermeiden, wird der Inhalt eines Erlenmeyerkolbens sofort nach Versuchsbeginn auf 10 Reagenzröhrchen aus Kunststoff (Größe 10 ml) in Portionen zu je 1 ml verteilt und die Röhrchen mit Stopfen verschlossen. Sie bleiben bis zum jeweiligen Einbaustop im Wasserbad bei 37° C. Der Stoffwechsel der Zellen und damit der Einbau der radioaktiven Vorstufen wird beendet durch Zugabe von 5 ml eiskaltem PBS-Puffer je Reagenzröhrchen; die Reagenzröhrchen werden in Eiswasser gestellt und können bis zu einer Stunde darin belassen werden.

Durch 2-maliges Waschen mit PBS-Puffer werden die Zellen von den radioaktiven Vorstufen gereinigt, die noch im verdünnten Medium oder an den Zellwänden adsorbiert waren. Die Zellen werden danach in destilliertem Wasser resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, aufgetaut und nochmals eingefroren und dadurch aufgeschlossen. Durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 7,5 %) fallen die Makromoleküle DNA, RNA und Protein aus und werden durch Filtration auf Nitrozellulosefilter gesammelt. Nach Trocknen der Filter werden diese in Szintillatorgläschen mit Toluol-Szintillator-Flüssigkeit versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler die gefällte Radioaktivität gemessen. Details siehe Schema.

Arbeitsschema der Zellinkubation und -aufarbeitung

Präparation der
EAT-Zellsuspension 10 OD/ml

Ansetzen der Inkubations-
media in 25 ml-Erlenmeyer-
kolben

Aufbewahren in Eis

Anwärmen im Wasserbad
bei 37° C

Versuchsstart durch Zugabe von 500 µl Zellsuspension
zu 11 ml Inkubationsmedium mittels automat. Pipette,
kurzes Schwenken

sofortige Verteilung des Einbauansatzes (11,5 ml)
auf 10 x 1 ml in Reagenzröhrchen

Inkubation im Wasserbad bis zum jeweiligen Stop-
Zeitpunkt (5 - 180 Minuten nach Start)

Einbaustop durch Zugabe von 5 ml eiskaltem PBS
je Reagenzröhrchen

Zentrifugieren in Mistral 6 L bei 2000 U/min
= 1050 xg für 7,5 Minuten bei 4° C

Überstand verwerfen, Pellet in 5 ml kaltem PBS
resuspendieren

Zentrifugieren wie oben

Überstand verwerfen, Pellet in 1 ml aqua bidest.
resuspendieren

↓
Einfrieren der Zellen durch langsames Eintauchen
der Reagenzröhrchen in flüssigen Stickstoff

↓
Auftauen im Wasserbad (Raumtemperatur)

↓
Einfrieren wie oben

↓
Auftauen, Zugabe von 3,5 ml eiskalter TCA 10 %
und Belassen im Eisbad für mindestens 30 Minuten

↓
Filtrieren durch Nitrozellulose-Filter (Poren-
größe 0,45 μ m) und Nachwaschen der Filter
2 x TCA 5 %, 1 x aqua bidest.

↓
Trocknen der Filter (Wärmeschrank)

↓
Einbringen der Filter in Szintillationsgläschen,
Versetzen mit 6 ml Toluol-Szintillator

↓
Messen der Radioaktivität im Flüssigkeits-
Szintillationszähler

Der Szintillationszähler (Packard 3385) wurde wie folgt
eingestellt:

	A - B	Verstärkung
1. Kanal (^3H + ^{14}C)	25 - 350	70 %
2. Kanal (^{14}C)	200 - 1000	7,5 %

Etwa 35 % der ^{14}C -counts fallen in den 1. Kanal, die Werte für die ^3H -Zerfälle müssen gegebenenfalls um diesen Wert korrigiert werden. In den 2. Kanal fallen keine ^3H -counts. Um die Überlagerung im 1. Kanal klein zu halten, wurde die spezifische Aktivität der ^3H -markierten Moleküle 10-fach höher gewählt als die der ^{14}C -markierten.

2.5.3. Vereinfachte Zellaufbereitung

Da der vorstehend beschriebene Ablauf der Zellaufarbeitung sehr zeitaufwendig ist, wurde auch ein vereinfachtes Verfahren angewandt, bei dem die EAT-Zellen (genauer ein Aliquot des Inkubationsmediums) direkt in TCA pipetiert wurden. Das Inkubationsmedium hatte eine andere quantitative Zusammensetzung, die Zellen wurden für längstens 100 Minuten inkubiert. Die so gewonnenen Meßwerte (Radioaktivität im säurefällbaren Material) streuten allerdings erheblich mehr als die des Verfahrens nach 2.5.2.. Daher wurde es nur einige Male angewandt, um wirksame Konzentrationsbereiche von Hemmstoffen in Vorversuchen einzugrenzen.

Zusammensetzung des Inkubationsmediums

HBSS	2600 µl
Aminosäuregemisch nach 2.2.3.	500 µl
¹⁴ C-Phe CFB 70 verdünnt 1 : 10 mit Wasser	20 µl
Phe 10 ⁻³ M	40 µl
³ H-Uridin TRK 178	10 µl
Uridin 10 ⁻³ M	25 µl
Hemmstofflösung	n µl
aqua bidest. ad	3400 µl
spezifische Radioaktivität von Phe	= 2,5 Ci/Mol
spezifische Radioaktivität von Uridin	= 395 Ci/Mol

Die Lösungen wurden in ein zylindrisches Gläschen von ca. 10 ml Fassungsvermögen pipettiert und dieses mit einem Plastikdeckel verschlossen. Jedes Gläschen enthielt einen magnetischen Rührfisch 15 mm lang. Bei 37° C im Brutraum wurden die Inkubationsansätze auf einer Magnet-rührplatte angewärmt; die Zellinkubation erfolgte ebenfalls im Brutraum.

Zum Reaktionsstart wurden 600 µl der Zellsuspension nach 2.4.4. einpipettiert.

Nach dem Start wurden im 10-minütigen Abständen jeweils 300 µl des Inkubationsmediums mit einer automatischen Pipette entnommen und in 7 ml eiskalte TCA 10 % pipettiert. Nach einer Stunde wurden die einzelnen Proben über Nitro-zellulose-Filter (Porengröße 0,45 µm) abfiltriert, die Reagenzröhrchen dabei 3 x mit TCA und 2 x mit Wasser nach-gespült.

Nach dem Trocknen der Filter wurden diese weiterbehandelt wie in 2.5.2..

2.6. Aminoacylierung von tRNA aus EAT-Zellen

Das Prinzip wird in 3.8. kurz besprochen. Die Methode wurde ausführlich von U. Huschka beschrieben (35).

EAT-Zellen werden mittels Ultraschall aufgeschlossen und danach bei 20 000 xg zentrifugiert. Der Überstand, bezeichnet als "Enzymrohextrakt", enthält u.a. die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen; die tRNA wird in einem Verfahren ähnlich wie in (49) und (50) angegeben ebenfalls aus EAT-Zellen präpariert und in Wasser gelöst eingesetzt.

Der Reaktionsansatz (s.u.) wird in Eppendorf-caps (2,5 ml) pipettiert bis auf den Enzymrohextrakt und ATP. Nach Anwärmen für 10 Minuten im Wasserbad bei 25° C wird der Enzymrohextrakt zugegeben und nach 5 Minuten die Reaktion mit ATP gestartet.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches:

20 µl HEPES-Puffer 0,5 M pH 7,9

10 µl KCl 250 mM, 10 µl Mg Ac₂ 100 mM

10 µl ¹⁴C-Leucin CFB 67, 20 µl tRNA-Lösung

20 µl Enzymrohextrakt, 10 µl ATP-Lösung 114 mM

ACDOC- bzw. Naphthochinon-Lösung, H₂O ad 250 µl

Im Abstand von 2 Minuten werden nach Reaktionsstart 50 µl aus dem jeweiligen Reaktionsansatz entnommen, auf Papierfilterplättchen pipettiert und diese sofort in eiskalte 10 % TCA geworfen. Danach wird die Reaktion gestopt und die nun teilweise mit radioaktiver Aminosäure beladene tRNA ausgefällt. Nach mindestens 10 Minuten werden die Filterplättchen auf Filterpapier zum Trocknen gelegt und nach kurzer Zeit in eiskalte 50 % TCA geworfen. Danach werden die Filter weiter gewaschen in eiskalter 5 % TCA, in Äther/Alkohol 96 % 1 : 1 und in reinem Äther für jeweils 10 Minuten.

Nach jeder Entnahme aus einem Bad werden die Filter kurz auf Filterpapier getrocknet. Nach der Entnahme aus reinem Äther werden die Filterplättchen 30 Minuten im Wärmeschränk getrocknet, in Gläschen gelegt, mit 6 ml Toluolszintillator versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche

3.1.1. Messung der RNA- und Proteinsynthese von EAT-Zellen in EBSS-Puffer mit und ohne Calcium

Der Puffer PBS, in dem die EAT-Zellen nach der Entnahme aus der Maus aufgenommen werden, enthält kein Calcium, um eine Fibrinaktivierung und ein Verklumpen der Zellen zu verhindern.

Es wurde untersucht, ob die Calciumionen im Inkubationsmedium einen nachteiligen Effekt aufweisen, so daß etwa durch Zellaggregation die bei den einzelnen Stops entnommenen Zellmengen erheblich differieren würden. Der Puffer EBSS wurde einmal mit und einmal ohne CaCl_2 (Konzentration 1,8 mM) angesetzt und jeweils als Inkubationspuffer verwendet. Da die gemessenen Radioaktivitätsmengen und damit die Einbau- bzw. Syntheseraten bei beiden Puffern gleich waren (Abb.1), wurde immer nur der Ca-haltige EBSS-Puffer verwandt.

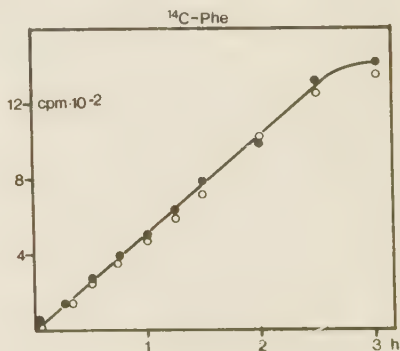
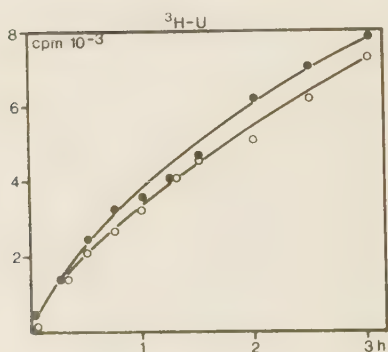


Abb.1: Inkubation der EAT-Zellen mit und ohne Calcium

Die EAT-Zellen wurden wie in 2.5.2. beschrieben mit Aminosäuren inkubiert in:

- a) EBSS-Puffer nach 2.2.2. mit Calcium 1,8 mM • - •
- b) EBSS-Puffer ohne Calcium o - o

bei sonst gleichen Bedingungen. Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

3.1.2. RNA- und Proteinsynthese in EAT-Zellen und deren Hemmung durch ACDOC bei Inkubation in verschiedenen Puffern

Die EAT-Zellen wurden in 4 verschiedenen Puffern inkubiert, um zu prüfen, ob die Puffer selbst einen Einfluß auf den Einbau der radioaktiv markierten Substanzen haben oder auf die hemmende Wirkung von ACDOC. Es wurden HBSS-, EBSS-, Tris-Citrat- und HEPES-Puffer eingesetzt (Zusammensetzung siehe 2.2.2.).

Im Vergleich zum HEPES-Puffer wurde im Inkubationsmedium mit Tris-Citrat-Puffer nur 75 % Uridin und 66 % Phenylalanin eingebaut; die Werte bei HBSS und EBSS waren nur gering niedriger als bei HEPES (Abb.2).

Die Hemmung des radioaktiven Einbaus durch ACDOC war dagegen bei Tris-Citrat am geringsten, aber insgesamt bei den vier Puffern in gleicher Größenordnung.

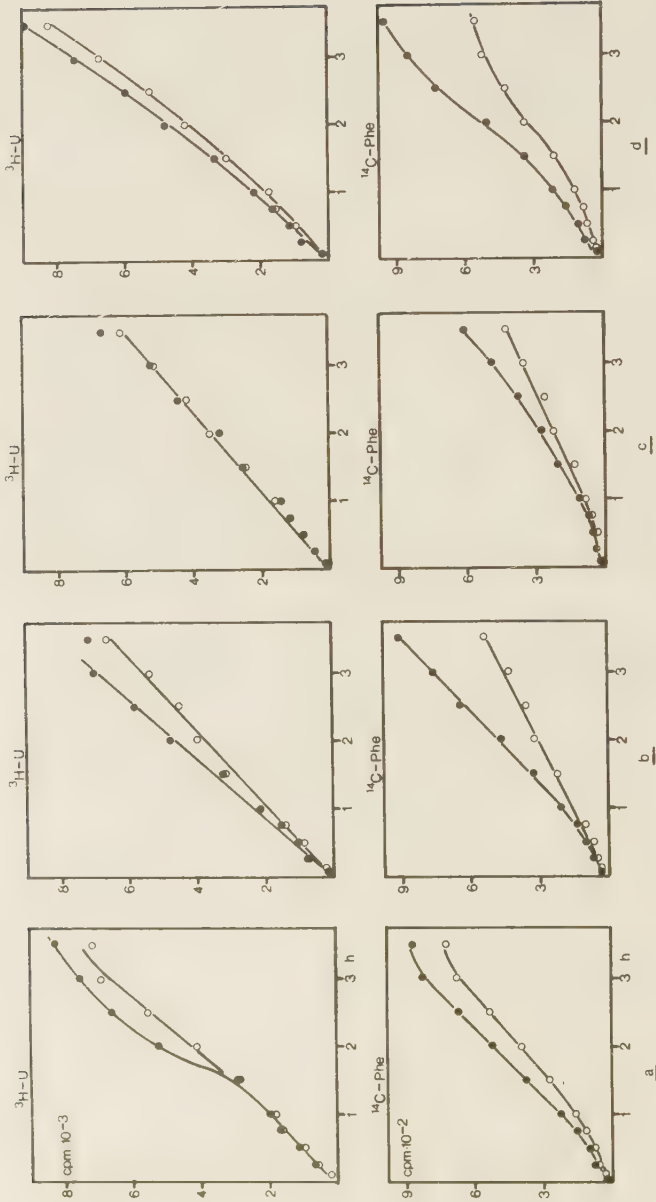


Abb. 2: EAT-Zellinkubation in 4 verschiedenen Puffern ohne und mit ACDOC. Das Inkubationsmedium (nach 2.5.2., mit dem Aminosäuregemisch nach 2.2.3.) wurde mit 4 verschiedenen Puffern angesetzt. Die Zellen wurden in jedem Puffer ohne und mit ACDOC inkubiert; gemessen wurde der Einbau von $^3\text{H-Uridin}$ und $^{14}\text{C-Phenylalanin}$ in säurefällbares Material. $\underline{a}$ BESS, $\underline{b}$ BESS, $\underline{c}$ Tris-Citrat, $\underline{d}$ HEPES; ●-● ohne ACDOC, o-o mit ACDOC 5,2 μM

3.1.3. Vergleich der säurefällbaren Radioaktivitätsmengen bei EAT-Zellinkubation mit einer ^{14}C -Phenylalanin-Einbaulösung mit erhöhter spezifischer Radioaktivität

Werden die Zellen im Aminosäuremangel inkubiert, also z.B. ohne das Aminosäuregemisch As-Phe, ist die Proteinsynthese und damit der Einbau von ^{14}C -Phe in säurefällbares Material stark verringert. Die Zahl der radioaktiven Zerfälle lag dann bei den anfangs gewählten Konzentrationen zwischen 200 und 300 cpm. Je niedriger aber die absolut gemessene Zerfallsrate ist, desto höher wird der Meßfehler, da die Leerwerte, d.h. nur Szintillationsflüssigkeit oder diese mit Filter und Zellen, zwischen 10 und 15 cpm liegen und auch für das Zählgerät ein Meßfehler bei z.B. 50 cpm, Zählzeit 10 Minuten, von 4,5 % angegeben wird.

Um die Menge an eingebauter Radioaktivität zu erhöhen, wurde den EAT-Zellen bei sonst gleichen Bedingungen eine Phe-Einbaulösung angeboten mit doppelter spezifischer Radioaktivität bei gleicher Phe-Gesamtkonzentration (siehe 2.2.1.). Damit erzielt man eine doppelt so große radioaktive Markierung (Abb.3); die Phe-Einbaulösung II wird bei einem Teil der Versuche (bei Aminosäuremangel) verwandt. Mit der zweifachen Menge der Phe-Einbaulösung II im Inkubationsansatz (d.h. 40 μl statt 20 μl) erhöht sich die radioaktive Markierung nur um ca. 25 %, daher kann man annehmen, daß Phe in genügend hoher Konzentration den Zellen zur Aufnahme vorliegt.

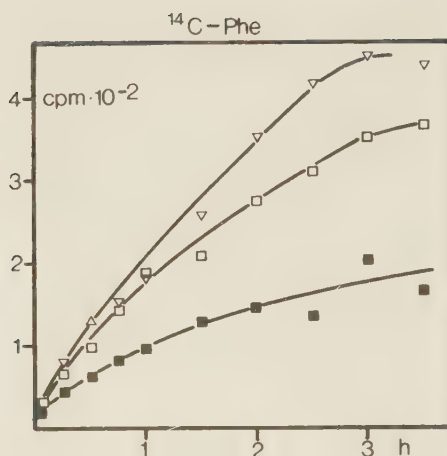


Abb.3: Erhöhte Konzentration von ^{14}C -Phenylalanin im Inkubationsmedium

Die Phenylalanin-Einbaulösung I wurde verglichen mit der Phe-Einbaulösung II (Zusammensetzung beider Lösungen siehe 2.2.1.), deren spezifische Radioaktivität doppelt so hoch ist bei gleicher Gesamtkonzentration von Phe. Den EAT-Zellen wurde also eine größere Radioaktivitätsmenge zum Einbau in Protein angeboten. Inkubation der Zellen wie in 2.5.2. angegeben, ohne Aminosäurelösung As-Phe.

- Einbaulösung I mit 0,344 Ci/Mol
- Einbaulösung II mit 0,686 Ci/Mol
- ▽-▽ Zweifache Menge der Einbaulösung II

3.1.4. Hydrolyse der Nukleinsäuren durch Trichloressigsäure nach Einbau von ^3H -Uridin

Es wurde untersucht, ob nach Säurehydrolyse von Nukleinsäuren (speziell RNA) Radioaktivität im verbleibenden säurefällbaren Material gemessen werden kann. Dazu wurden EAT-Zellen mit Aminosäuren inkubiert wie unter 2.5.2. beschrieben, aber nur mit ^3H -Uridin-Einbaulösung, also ohne

¹⁴C-Phenylalanin. Die Zellen wurden wie üblich weiterverarbeitet, nach dem 2. Einfrieren mit 3,5 ml TCA 10 % je Entnahmeprobe versetzt, für 35 Minuten bei 90° C erhitzt, nach dem Abkühlen über Membranfilter abfiltriert und die Radioaktivität auf den Filtern gemessen. Die Meßwerte der Entnahmeprobe entsprachen mit einem Mittelwert von 28 cpm etwa dem zu erwartenden Leerwert, im Gegensatz zu 4000 cpm nach 3,5 Stunden im Kontrollansatz. Es zeigt sich also, daß die Nukleinsäuren (speziell RNA) unter diesen Bedingungen hydrolysiert werden. Außerdem zeigt der Versuch, daß kein Einbau von ³H-Uridin in Protein während der Inkubation stattfand. Da Protein unter den obigen Bedingungen nicht hydrolysiert wird, bleibt es säuregefällt auf den Filtern und eingebautes ³H könnte nachgewiesen werden.

3.1.5. Längeres Einfrieren der Proben während der Aufarbeitung

Die einzelnen Entnahmeprobe eines Inkubationsansatzes wurden verarbeitet wie in 2.5.2. angegeben, allerdings nach dem 2. Einfrieren in flüssigem Stickstoff nicht wieder aufgetaut, sondern bei - 20° C für 24 Stunden aufbewahrt und dann weiterverarbeitet. Es ergab sich kein auffälliger Unterschied der gemessenen Radioaktivität im Vergleich zu der sofort weiterverarbeiteten Kontrolle (Abb.4).

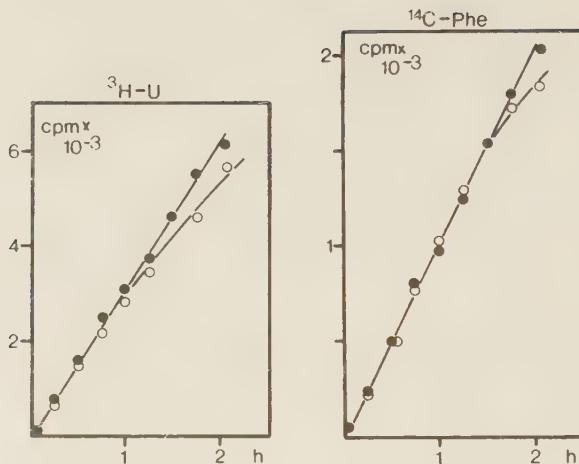


Abb.4: Längeres Einfrieren der Proben bei der Aufarbeitung

Die EAT-Zellen wurden mit Aminosäuregemisch inkubiert und weiterverarbeitet wie in 2.5.2. angegeben. Die Entnahmeproben eines Inkubationsansatzes wurden nach dem 2. Einfrieren in flüssigem Stickstoff für 24 Stunden bei -20°C aufbewahrt und erst danach weiterverarbeitet.

- Ansatz 1: fortlaufend verarbeitete Entnahmeproben
- o-o Ansatz 2: Entnahmeproben 24 h eingefroren

3.2. Untersuchung des Chinons 3105

Der hier verwandte Versuchsaufbau war erarbeitet worden (G. Frank/A. Ogilvie, unveröffentlichte Ergebnisse), um das synthetische Chinolinchinon ACDOC (siehe 2.1.1.) in seiner Wirkung auf die Protein- und Nukleinsäuresynthese bei Eukarionten zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine

konzentrationsabhängige hemmende Wirkung auf den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in säurefällbares Material. Wenn auch andere Moleküle mit Chinonstruktur eine ähnliche Wirkung zeigen, wäre das ein Hinweis auf einen spezifischen Reaktionsmechanismus der Chinone.

Als erstes dem ACDOC ähnliches Molekül wurde das so bezeichnete "3105" untersucht (siehe 2.1.2.), das sich vom ACDOC durch den Austausch des Chloratoms am Kohlenstoffatom 7 gegen eine Thiomethylgruppe unterscheidet.

3.2.1. Wirkung von 3105 im aminosäurehaltigen Inkubationsmedium auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen

Nach Präparation der EAT-Zellen aus der Maus (2.4.4.) wurden diese bei Zugabe des Aminosäuregemisches inkubiert wie unter 2.5.2 beschrieben und der zu untersuchende Hemmstoff 3105 in wässriger Lösung zugegeben. Gemessen wurde als Maß der Nukleinsäure- und Proteinsynthese der Einbau von ^3H -Uridin bzw. ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material in Doppelmarkierungstechnik.

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der RNA- und Proteinsynthese (Abb.6)

Der Einbau von Phenylalanin wird bei jeder der eingesetzten Hemmstoffkonzentrationen erniedrigt, der Uridin-Einbau aber erst bei Zugabe von 100 μl 3105-Lösung, ist also unempfindlicher gegenüber der Einwirkung von 3105. Um diese unterschiedliche Hemmung zu verdeutlichen und auch mit anderen Wachstumsbedingungen, z.B. ohne Aminosäuren, vergleichen zu können, wurde die Steigung der einzelnen Einbaukurven verglichen.

Die Steigung ist ein Maß für die Anzahl von Ereignissen zu einem bestimmten Zeitpunkt, in diesem Fall gemessene radioaktive Zerfälle pro Zeit entsprechend der Menge der ein-

gebauten Radioaktivität, ist unabhängig vom Leerwert und gibt ein genaueres Bild als der Vergleich der jeweiligen cpm-Werte. Sie ist der tangens des Winkels α , den die Tangente der Kurve zu einem bestimmten Zeitpunkt, z.B. 1 Stunde, gegen die Abszisse einnimmt und wurde graphisch ermittelt, oder ist bei linearem Einbau der Geradengleichung $y = a + bx$ zu entnehmen. Die Steigung des Kontrollansatzes, d.h. ohne Hemmstoff, wurde zu 100 % gesetzt und die Steigungen der anderen Kurven dazu verglichen (negative Werte von $\tan \alpha$ wurden als 0 gesetzt).

Aus Abb.7 ist auf diese Weise gut zu entnehmen, daß der Phenylalanin-Einbau stärker als der Uridin-Einbau gehemmt ist. Letzterer wird erst durch höhere Hemmstoffkonzentration oder zeitlich später gehemmt, kommt aber ebenfalls bei der höchsten 3105-Konzentration zum Erliegen.

Beim Stagnieren der Makromolekülsynthese müßte man eine für die restliche Inkubationszeit gleichbleibende Radioaktivitätsmenge erwarten. Tatsächlich wird diese aber bei hohen Hemmstoffkonzentrationen gegen Ende der Inkubationszeit geringer (z.B. bei $6,7 \mu\text{M}$). Das wird auf eine zytotoxisch bedingte Lyse eines Teiles der EAT-Zellen zurückgeführt und dadurch bedingten Abbau der Makromoleküle.

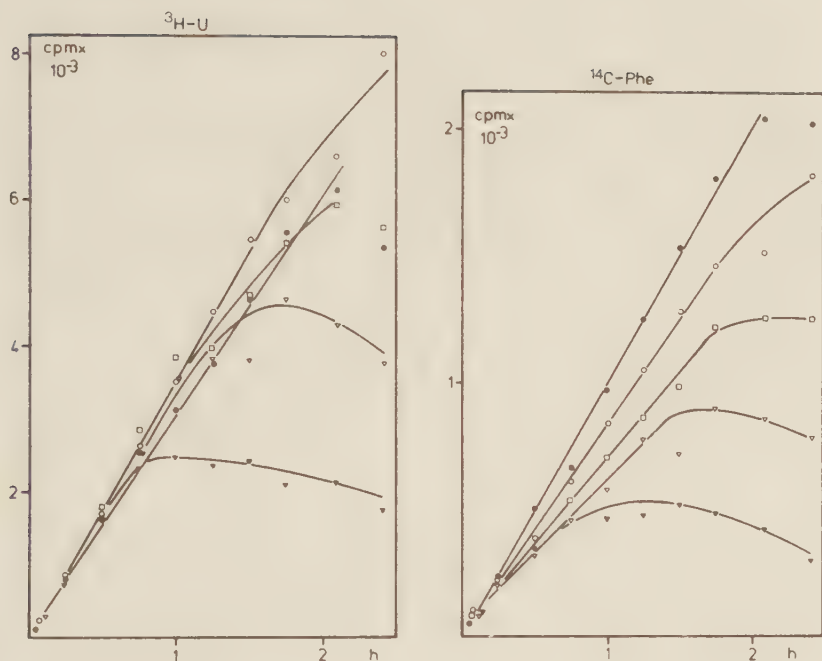


Abb.6: Wirkung von 3105 im aminosäurehaltigen Inkubationsmedium auf die RNA- und Proteinsynthese

Die EAT-Zellen wurden wie in 2.5.2. angegeben inkubiert mit dem Aminosäuregemisch As-Phe und mit steigender Konzentration von 3105, zugegeben als gesättigte wässrige Lösung. Gemessen wurde die eingebaute Radioaktivität von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

- | | | |
|-----|--------------------------|-------------------|
| ●-● | Kontrollansatz ohne 3105 | |
| ○-○ | 3105-Konzentration | 3,3 μM |
| □-□ | 3105-Konzentration | 4,5 μM |
| ▽-▽ | 3105-Konzentration | 5,6 μM |
| ▼-▼ | 3105-Konzentration | 6,7 μM |

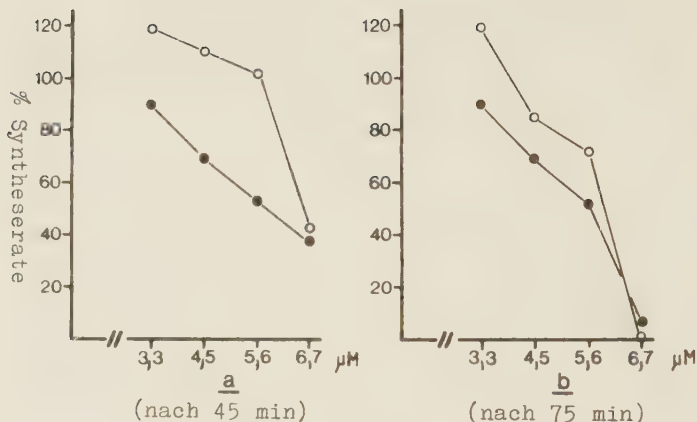


Abb.7: Relative Hemmung der Makromolekülsynthese durch 3105 im aminosäurehaltigen Medium

Diese Darstellung setzt in Relation zueinander die Einbaukurven cpm gegen Inkubationszeit der jeweiligen Ansätze aus Abb.6. Von diesen Kurven wurden die Steigungen an den Zeitpunkten 045 und 115 bestimmt und als Prozentwerte, bezogen auf den Kontrollansatz ohne Chinon, gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen. Ein Punkt repräsentiert einen Inkubationsansatz.

a: Ordinate: Prozentzahlen der tan α -Werte nach 45 Minuten Inkubationsdauer, Kontrollansatz ohne Chinon = 100 %; Abszisse = Hemmstoffkonzentration

b: dieselbe Darstellung für 75 Minuten Zellinkubation.

o-o ³H-Uridin-Einbau
●-● ¹⁴C-Phenylalanin-Einbau

3.2.2. Wirkung von 3105 im aminosäurefreien Inkubationsmedium auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen

Die Hemmwirkung von ACDOC auf den Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin bei E. coli (29,30,52) und EAT-Zellen (34) ist in aminosäurefreiem Inkubationsmedium stärker als bei Zusatz von Aminosäuren.

Da untersucht werden soll, ob 3105 ähnliche Wirkungen wie ACDOC zeigt, wurden EAT-Zellen ohne Aminosäuren inkubiert bei Zugabe von 3105.

Abb.8 zeigt je einen Kontrollansatz und einen Ansatz mit 3105 im aminosäurehaltigen und im aminosäurefreien Inkubationsmedium.

Die Bezeichnungen "aminosäurehaltig" und "aminosäurefrei" geben an, ob das Aminosäuregemisch nach 2.2.3. dem Inkubationspuffer zugegeben wurde oder nicht. Auch im sogenannten "aminosäurefreien" Inkubationspuffer ist Phenylalanin in der Konzentration 8,43 μM enthalten als Markierungssubstanz für die Proteinsynthese bei der angewandten Doppelmarkierungstechnik (siehe 2.5.1.); darauf wird im folgenden nicht mehr eigens hingewiesen.

Vergleicht man in Abb.8 die Einbaukurven der Ansätze ohne Chinon (= Kontrollansätze), so ist der Einbau von ^3H -Uridin bei Aminosäuremangel um 1/3 geringer als mit Aminosäuren. Der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin ist bei Aminosäuremangel weit stärker gesenkt und beträgt nur 1/7 des Einbaues mit Aminosäuren.

Die hemmende Wirkung von 3105 im aminosäurefreien Medium ist nur gering verstärkt und zeigt sich erst nach etwa 90 Minuten durch Stagnieren des Einbaues der Vorstufen. Auch läßt sich ein ausgeprägter Schutzeffekt der Aminosäuren nicht darstellen.

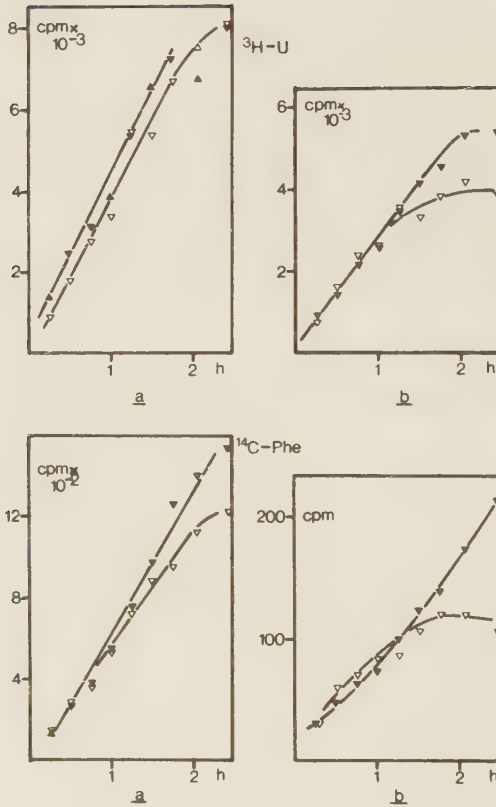


Abb.8: Wirkung von 3105 im aminosäurefreien Inkubationsmedium auf die RNA- und Proteinsynthese

Es wird die Wirkung von 3105 bei der Inkubation von EAT-Zellen mit und ohne Aminosäuren gegenübergestellt. Zellinkubation nach 2.5.2.; gemessen wird der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

a Aminosäuregemisch (angegeben in 2.2.3.) im Inkubationsmedium

b Inkubation ohne Aminosäuregemisch

▼-▼ Kontrollansatz

▽-▽ 3105-Konzentration 5,6 μM

3.2.3. Hemmung des Thymidin-Einbaus durch 3105 bei Inkubation der EAT-Zellen mit Aminosäuren

Das von der Arbeitsgruppe Ogilvie untersuchte ACDOC hemmt bei EAT-Zellen den Einbau von Thymidin ebenso wie den von Uridin und Phenylalanin.

Thymidin kann ebenfalls radioaktiv markiert werden und wird wie Uridin aus dem Inkubationsmedium aufgenommen und in säurefällbares Material eingebaut. Es wird als Indikator für die DNA-Synthese herangezogen (siehe auch 2.5.1.). Da sowohl das hier benutzte Thymidin als auch das Uridin durch ein Tritium-Molekül radioaktiv markiert sind, müssen beide in getrennten Inkubationsansätzen angewandt werden, da sich nach Einbau in säurefällbares Material die zu messende Radioaktivität addiert, ohne daß zwischen den jeweiligen Anteilen unterschieden werden kann. Die Zugabe des ^{14}C -markierten Phenylalanins bleibt davon unberührt.

Die EAT-Zellen wurden in Ansätzen, die entweder Thymidin und Phenylalanin oder Uridin und Phenylalanin enthielten, inkubiert und verschiedene Hemmstoffkonzentrationen zugegeben (Abb.9). Die Zellen wurden mit dem Aminosäuregemisch nach 2.2.3. inkubiert.

Ebenso wie der Einbau von Uridin und Phenylalanin wird auch der Einbau von Thymidin gehemmt. Er ist bei allen Hemmstoffkonzentrationen am stärksten betroffen; bei $5,0\text{ }\mu\text{M}$ 3105 z.B. wird noch genauso viel Uridin eingebaut wie im Kontrollansatz, aber Thymidin nur noch zu ca. 50 %. Diese unterschiedliche Wirkung läßt sich am besten verdeutlichen durch die jeweiligen Steigungen der Einbaukurven, verglichen zu einem bestimmten Zeitpunkt. Abb.10 zeigt, daß der Thymidin-Einbau am stärksten gehemmt wird und daß der Unterschied beträchtlich ist.

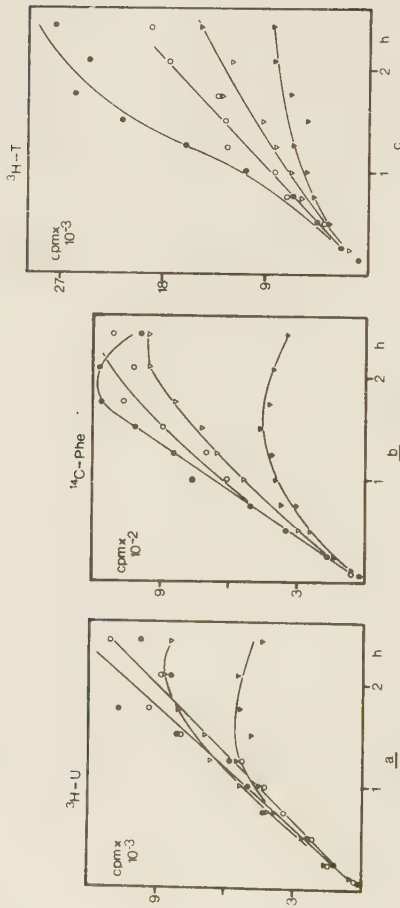


Abb. 9: Vergleich der hemmenden Wirkung von 3105 auf den Einbau von Uridin, Phenylalanin und Thymidin bei Inkubation der EAT-Zellen mit Aminosäuren

In einem Teil der Inkubationsansätze wurden die Zellen nicht mit Uridin, sondern mit der ^3H -Thymidin-Lösung nach 2.2.1. inkubiert bei sonst gleichem Vorgehen (2.5.2.). Jeweils ein Kontrollansatz ohne und 3 Ansätze mit 3105 ermöglichten die Auswirkung auf den Thymidin- und Uridin-Einbau zu vergleichen. Gemessen wurde die in säurefällbares Material eingebaute Radioaktivität.

a. ^3H -Uridin-Einbau; b. ^{14}C -Phenylalanin-Einbau; c. ^3H -Thymidin-Einbau
 ●-● ohne 3105 o-o 3,9 μM 3105 ▼-▼ 6,1 μM 3105

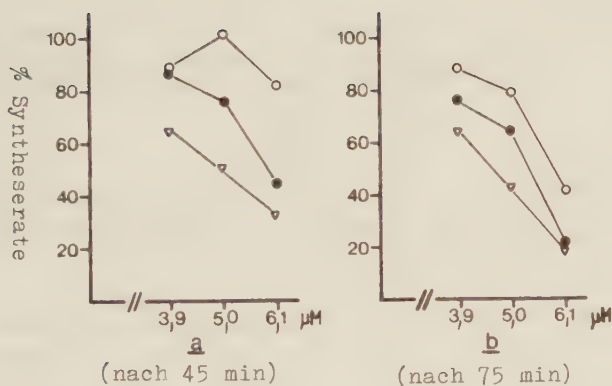


Abb.10: Relative Hemmung der Einbauraten von Uridin, Phenylalanin und Thymidin bei 3105-Zugabe im amino-säurehaltigen Medium

Die Steigungen der Einbaukurven aus Abb.9 wurden zu den Zeitpunkten 45 Minuten und 75 Minuten bestimmt und als Prozentwerte, bezogen auf den jeweiligen Kontrollansatz ohne Chinon, gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen.

a: 45 Minuten Inkubationsdauer, Ordinate: Prozentzahlen der $\tan \alpha$ -Werte bezogen auf den Kontrollansatz ohne Chinon = 100 %; Abszisse: Hemmstoffkonzentration (3105)

b: dieselbe Darstellung für 75 Minuten Zellinkubation

o-o ^3H -Uridin-Einbau
 ●-● ^{14}C -Phenylalanin-Einbau
 ▼-▼ ^3H -Thymidin-Einbau

3.3. Untersuchung von Benzochinon

Benzochinon ist die Grundstruktur der Chinone; es lag daher nahe, dieses Molekül auf seine Wirkung zu untersuchen.

3.3.1. Beeinflussung der RNA- und Proteinsynthese durch Benzochinon bei Inkubation der EAT-Zellen in amino-säurehaltigem Inkubationsmedium

Die EAT-Zellen wurden in Puffer mit Aminosäuren inkubiert. Benzochinon wurde in Form einer wässrigen Lösung (Konzentration 1,85 mM) zu den einzelnen Ansätzen zugegeben, so daß die Konzentrationen in den Inkubationsmedien zwischen 3,2 μ M (348 ng/ml) und 32 μ M (3,4 μ g/ml) lagen.

Benzochinon hemmt den Einbau von Uridin und Phenylalanin in säurefällbares Material, d.h. es hemmt die Synthese von RNA und Protein (Abb.11). Während allerdings die Einbauhemmung von Phenylalanin mit steigender Benzochinon-Konzentration stufenweise zunimmt, wird der Uridin-Einbau nur bei der höchsten Konzentration (32 μ M) gehemmt, bei welcher der Phenylalanin-Einbau fast ganz stagniert. Bei den geringeren Benzochinon-Konzentrationen ist der Uridin-Einbau gegenüber dem Kontrollansatz sogar etwas erhöht; dies war bei allen Versuchen mit Benzochinon zu beobachten.

Abb.12 zeigt das Versuchsergebnis anhand der Steigungen der Einbaukurven, bezogen auf den Kontrollansatz ohne Benzochinon.

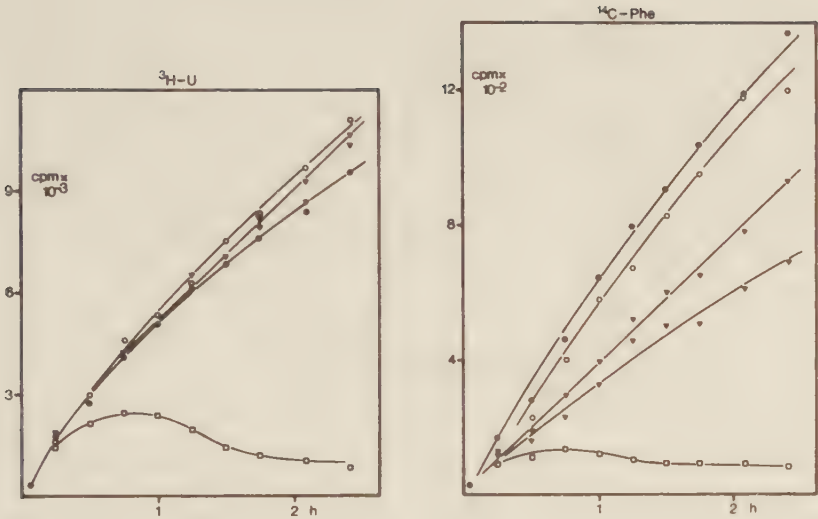


Abb.11: Hemmung des Einbaues von Uridin und Phenylalanin durch Benzochinon bei Inkubation der EAT-Zellen mit Aminosäuren

Die EAT-Zellen wurden mit Aminosäurelösung inkubiert nach 2.5.2. unter Zugabe von Benzochinon und der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material gemessen.

●-●	Kontrollansatz		
○-○	Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium	3,2	μM
▼-▼	Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium	8,06	μM
▽-▽	Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium	16	μM
□-□	Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium	32	μM

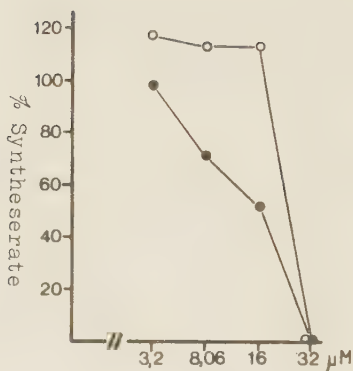


Abb.12: Relative Hemmung der Einbauraten durch Benzochinon bei Aminosäurezugabe.

Zum Zeitpunkt 75 Minuten nach Inkubationsbeginn wurden die Steigungen der Einbaukurven aus Abb.11 bestimmt und als Prozentwerte, bezogen auf den Kontrollansatz ohne Chinon, gegen die Hemmstoffkonzentrationen eingetragen.

- o-o Uridin-Einbau
- Phenylalanin-Einbau

3.3.2. Wirkung von Benzochinon im aminosäurefreien Medium auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen

Es soll untersucht werden, ob Benzochinon im Inkubationsmedium ohne Aminosäuren eine andere Wirkung auf die EAT-Zellen hat als bei Aminosäure-Zusatz, und das bedeutet hier, ob der Einbau der radioaktiv markierten Moleküle verringert, gleich oder gesteigert ist.

Die Zellen werden inkubiert wie in 2.5.2. angegeben, je eine Ansatzreihe mit und eine ohne Aminosäure-Lösung, und pro Reihe ein Kontrollansatz ohne und 2 Ansätze mit Benzochinon (4,8 und 8,06 μM).

Abb.13 zeigt bei Zellinkubation ohne Aminosäuren einen Um-

schlag von fast unvermindertem Einbau der Vorstufenmoleküle zu völliger Einbauhemmung, während im aminosäurehaltigen Medium der Einbau nur reduziert, aber nicht aufgehoben wird.

Die Zellen sind also ohne Aminosäuren empfindlicher, was auch Abb.14 anhand der Steigungen der Einbaukurven verdeutlicht.

Auf die unterschiedliche Menge der eingebauten Radioaktivität mit und ohne Aminosäuren wurde in 3.2.2. hingewiesen.

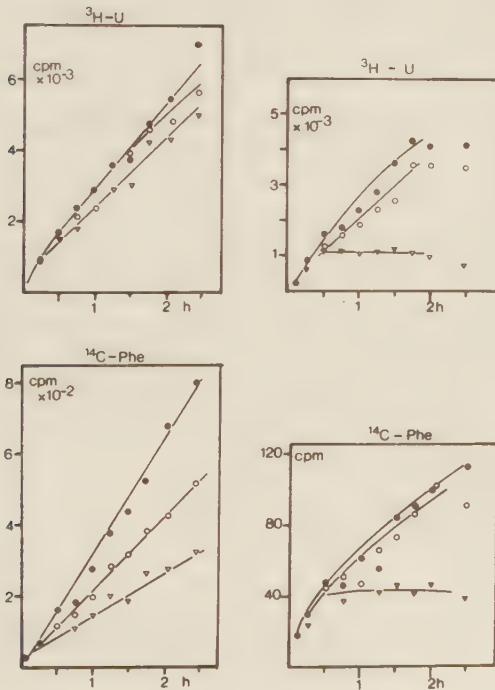


Abb.13: Vergleich der Wirkung von Benzochinon auf die RNA- und Proteinsynthese bei Zellinkubation mit und ohne Aminosäuren

Die EAT-Zellen werden in 3 Ansätzen mit und in 3 Ansätzen ohne Aminosäuregemisch inkubiert wie in 2.5.2. beschrieben. Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

- a Zugabe der Aminosäure-Lösung
b ohne Aminosäure-Lösung
 o-o Ansätze ohne Benzochinon
 ●-● Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium 4,8 μM
 ▽-▽ Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium 8,06 μM

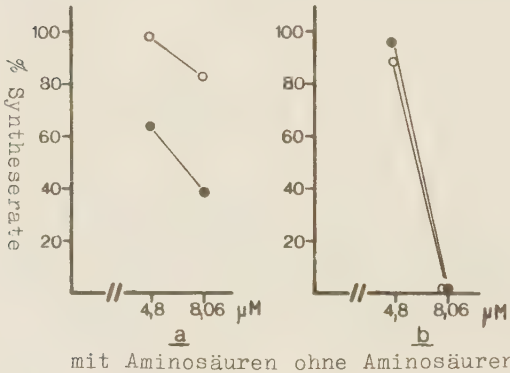


Abb.14: Vergleich der relativen Einbauhemmung durch Benzochinon bei aminosäurehaltigem und -freiem Inkubationsmedium (RNA- und Proteinsynthese)

Zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Inkubationsbeginn sind die Steigungen der Einbaukurven aus Abb.13 bestimmt worden und als Prozentteile der Steigung der Kontrollkurve (Ansatz ohne Benzochinon) dargestellt, aufgetragen gegen die Hemmstoffkonzentration im Inkubationsmedium

- a mit Aminosäure-Lösung
b ohne Aminosäure-Lösung
 o-o ^3H -Uridin
 ●-● ^{14}C -Phenylalanin

3.3.3. Einfluß von Benzochinon auf den Thymidineinbau der EAT-Zellen im aminosäurehaltigen Medium

Da das Chinon 3105 den Einbau von Thymidin in säurefällbares Material hemmt (siehe 3.2.3.), wurde auch Benzochinon daraufhin überprüft.

Die EAT-Zellen wurden in Inkubationsansätze eingebracht, die entweder ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin oder ^3H -Thymidin und ^{14}C -Phenylalanin enthielten sowie Benzochinon (außer die Kontrollansätze) und Aminosäurelösung.

Abb.15 und 16 zeigen, daß bei einer Benzochinonkonzentration von $9,7\text{ }\mu\text{M}$ der Thymidin-Einbau weit mehr gehemmt wird als der Uridin- und Phenylalanin-Einbau. Der Uridin-Einbau ist von den verwandten Benzochinon-Konzentrationen nur minimal betroffen. Es besteht also ein deutlicher Unterschied in der Einbauhemmung der beiden Nukleoside.

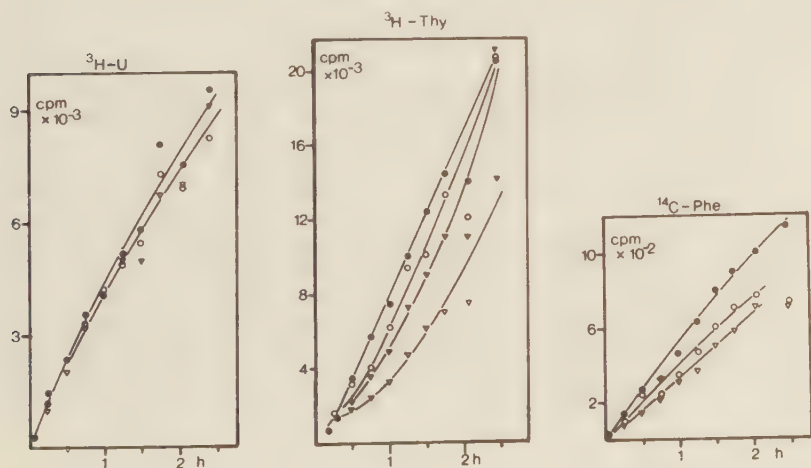


Abb.15: Wirkung von Benzochinon auf den Einbau von Thymidin im Vergleich zum Uridin- und Phenylalanin-Einbau im aminosäurehaltigen Medium

Die EAT-Zellen wurden inkubiert in 4 Ansätzen mit ^3H -Uridin und in 4 Ansätzen mit ^3H -Thymidin, jeweils mit ^{14}C -Phenylalanin und Aminosäuregemisch, wie in 2.5.2. angegeben. Gemessen wurde der Einbau in säurefällbares Material bei Zugabe von Benzochinon.

- Kontrollansätze ohne Benzochinon
- Benzochinonkonzentration im Inkubationsansatz 3,2 μM
- ▼-▼ Benzochinonkonzentration im Inkubationsansatz 6,4 μM
- ▽-▽ Benzochinonkonzentration im Inkubationsansatz 9,7 μM

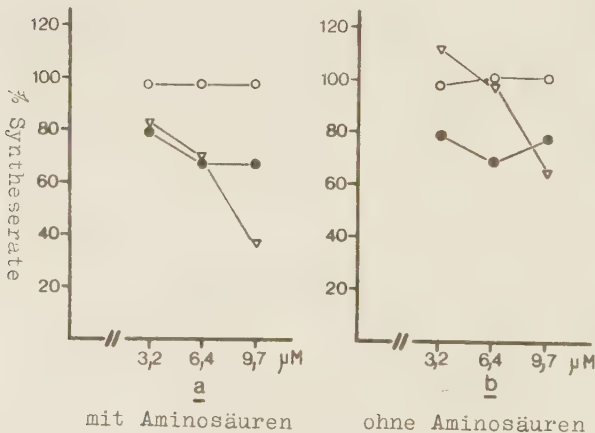


Abb.16: Vergleich der relativen Einbauhemmung von Thymidin, Uridin und Phenylalanin durch Benzochinon im aminosäurehaltigen Medium

Die Steigungen der Einbaukurven aus Abb.15 wurden zum Zeitpunkt 45 Minuten (a) und 90 Minuten (b) nach Inkubationsbeginn bestimmt und als Prozentzahlen der Steigung der Kontrollkurven (ohne Chinon) aufgetragen gegen die Hemmstoffkonzentration im Inkubationsmedium.

- Uridin
- Phenylalanin
- ▽-▽ Thymidin

3.3.4. Wirkung von Benzochinon auf den Thymidineinbau der EAT-Zellen im Aminosäuremangel

Entsprechend zu 3.3.2. soll untersucht werden, ob die Wirkung von Benzochinon auf den Thymidin-Einbau der EAT-Zellen sich ändert, wenn im Inkubationsmedium keine Aminosäuren (außer Phenylalanin) vorhanden sind.

Die Zellen wurden in 4 Reaktionsansätzen mit und in 3 Ansätzen ohne Aminosäuregemisch inkubiert, allen Ansätzen war ^3H -Thymidin und ^{14}C -Phenylalanin zugegeben. Zu den 2 Kontrollansätzen ohne Chinon kamen 3 Ansätze bzw. 2 Ansätze mit Benzochinon.

Abb.17 zeigt, daß bei Aminosäuremangel in den Kontrollansätzen nur halb so viel Thymidin in säurefällbares Material eingebaut wird wie bei Aminosäure-Zugabe. Die Wirkung von Benzochinon auf den Thymidin-Einbau bei Aminosäuremangel ist erheblich stärker als bei Anwesenheit von Aminosäuren: eine Benzochinonkonzentration von $6,4\text{ }\mu\text{M}$ senkt den Thymidin-Einbau auf 15 % des Kontrollansatzes bei Aminosäuremangel (ohne den Phenylalanin-Einbau zu beeinflussen), bei Aminosäurezugabe nur auf 65 %. Bei $13\text{ }\mu\text{M}$ Benzochinon läßt sich ohne Aminosäuren kein Thymidin-Einbau nachweisen im Gegensatz zur Inkubation mit Aminosäuren.

Abb.18 macht dieses Ergebnis deutlich mittels der relativen Einbauhemmung.

Die Wirkung von Benzochinon auf den Thymidin-Einbau ist also im Aminosäuremangel stärker. Im Vergleich der drei Makromolekül-Bausteine Phenylalanin, Uridin und Thymidin wird letzteres mit und ohne Aminosäuren am stärksten am Einbau gehindert.

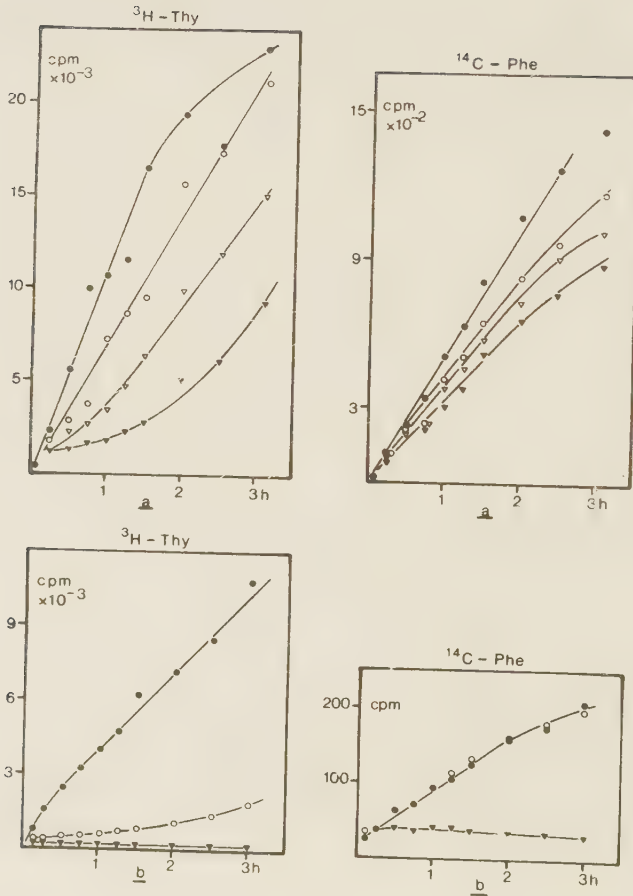


Abb.17: Vergleich der Wirkung von Benzoquinon auf den Thy-
midin-Einbau bei Aminosäure-Zugabe und -Mangel

Die EAT-Zellen wurden in 4 Ansätzen mit Aminosäuregemisch und in 3 Ansätzen ohne dieses inkubiert (siehe 2.5.2.). Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Thymin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material mit und ohne Benzochinon-Zugabe.

- a Zugabe des Aminosäuregemisches
b Aminosäuremangel
- | | | |
|-----|---|-------------------|
| ●-● | Kontrollansätze ohne Benzochinon | |
| ○-○ | Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium | 6,4 μM |
| ▽-▽ | Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium | 9,7 μM |
| ▼-▼ | Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium | 13 μM |

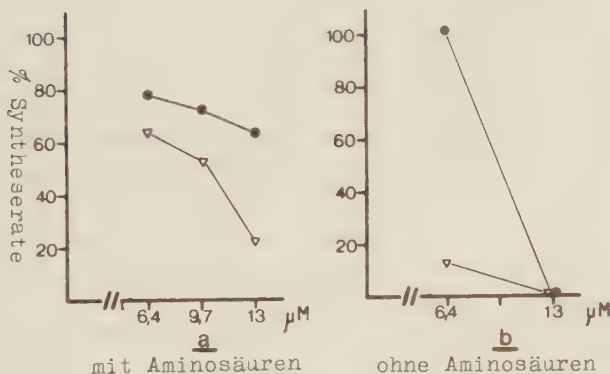


Abb.18: Relative Einbauhemmung von Thymin durch Benzochinon mit und ohne Aminosäuren

Es wurden die Steigungen der Einbaukurven aus Abb.17 90 Minuten nach Inkubationsbeginn gemessen und als Prozentbruchteile der Kontroll-Einbaukurven (ohne Chinon) gegen die Benzochinonkonzentration im Inkubationsmedium aufgetragen.

- a Zugabe der Aminosäurelösung
b Aminosäuremangel
- | | |
|-----|---------------------|
| ▽-▽ | Thymin-Einbau |
| ●-● | Phenylalanin-Einbau |

3.4. Untersuchung von Naphthochinon

Ebenfalls wegen seiner chemisch einfachen Struktur wurde 1,4-Naphthochinon getestet; es ist die Grundstruktur der Chinone, die sich vom Naphthalin ableiten lassen.

3.4.1. Wirkung von Naphthochinon auf die RNA- und Proteinsynthese von EAT-Zellen in Gegenwart von Aminosäuren

Wegen der geringen Wasserlöslichkeit des Naphthochinons wurde zuerst eine Suspension in Wasser mit der Konzentration 3,17 mM (0,5 mg/ml) verwandt. Diese Suspension bewirkt in einer Bakterienkultur eine etwa 50 % Wachstumshemmung bei einer Konzentration von 29 μ M (4,2 μ g/ml) im Kulturmedium.

Bei EAT-Zellen bewirkte Naphthochinon, zugegeben als Suspension, im Bereich zwischen 14 μ M (2,18 μ g/ml) und 69 μ M (10,9 μ g/ml) im Inkubationsmedium eine totale Hemmung des Einbaues von Uridin und Phenylalanin. Daher wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand (gesättigte Lösung) eingesetzt (entspr. 800 μ M = 140 μ g/ml). Abb.19 zeigt die Wirkung von Naphthochinon auf den Einbau von Uridin und Phenylalanin; 50 μ l des zentrifugierten Überstandes bewirken ein Aussetzen der Makromolekülsynthesen. Bereits 10 μ l der Suspension (2,76 μ M bzw. 0,435 μ g/ml im Inkubationsmedium) waren wirksam. Für die folgenden Versuche wurde nur der zentrifugierte Überstand benutzt.

Bei Inkubation der EAT-Zellen mit Aminosäuren und Naphthochinon war bei allen Einbaukurven von Phenylalanin eine anfangs geringere Steigung (d.h. stärkere Hemmung) zu beobachten; der Phenylalanineinbau zeigt also unter der Chinonhemmung eine Art Erholung ohne völlige Aufhebung der Hemmung während 2 1/2 Stunden.

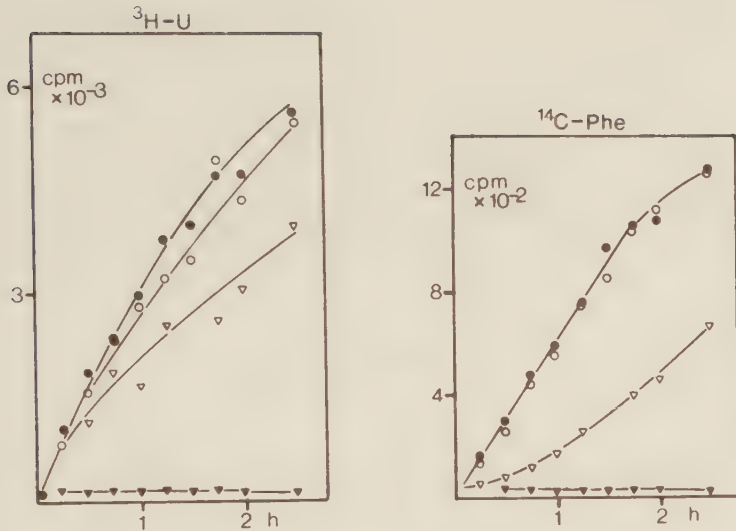


Abb.19: Einbauhemmung von Uridin und Phenylalanin durch Naphthochinon in Gegenwart von Aminosäuren

Bei den Bedingungen wie in 2.5.2. angegeben und Zugabe der Aminosäurelösung wurde Naphthochinon als Hemmstoff eingesetzt. Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

- Kontrollansatz ohne Chinon
 - 10 μl des zentrifugierten Überstandes (0,7 μM)
 - ▼-▼ 50 μl des zentrifugierten Überstandes (3,5 μM)
 - ▽-▽ 10 μl der Suspension (0,5 mg/ml);
- Konzentration im Inkubationsmedium 2,76 μM

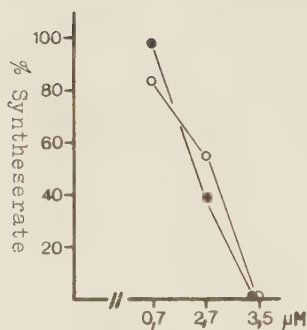


Abb.20: Relative Einbauhemmung von Uridin und Phenylalanin in EAT-Zellen im aminosäurehaltigen Medium

Es wurden die Steigungen der Einbaukurven von Uridin und Phenylalanin aus Abb.19 zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Inkubationsbeginn gemessen und als Prozentbruchteile der Kontrolleinbaukurven (Zellen ohne Chinon) gegen die Naphthochinon-Konzentration im Medium aufgetragen.

o-o Uridin-Einbau

●-● Phenylalanin-Einbau

3.4.2. Wirkung von Naphthochinon auf die RNA- und Proteinsynthese der EAT-Zellen im aminosäurefreien Medium

Es soll die Wirkung von Naphthochinon im Inkubationsmedium ohne Aminosäurelösung der bei Aminosäurezugabe gegenübergestellt werden. Die EAT-Zellen werden also mit und ohne Aminosäurelösung und verschiedenen Naphthochinon-Konzentrationen inkubiert und die Makromolekülsynthese (RNA und Protein) anhand des Einbaus von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin gemessen.

Bei Inkubation ohne Aminosäuren erweisen sich die EAT-Zellen überraschenderweise als unempfindlicher gegenüber

Naphthochinon (Abb.21). Bei 2,1 μM Naphthochinon wird bei Aminosäuremangel der Einbau von Uridin und Phenylalanin nicht vermindert (im Vergleich zum Kontrollansatz), bei Aminosäure-Zugabe ist der Uridin-Einbau auf 70 %, der Phenylalanin-Einbau auf 45 % des Kontrollansatzes gesenkt. Der Vergleich der Steigungen der Einbaukurven zeigt dies nochmals (Abb.22) und macht auch deutlich, daß Aminosäure-Zugabe die Naphthochinon-Wirkung auf den Phenylalanin-Einbau erheblich mehr verstärkt als auf den Uridin-Einbau.

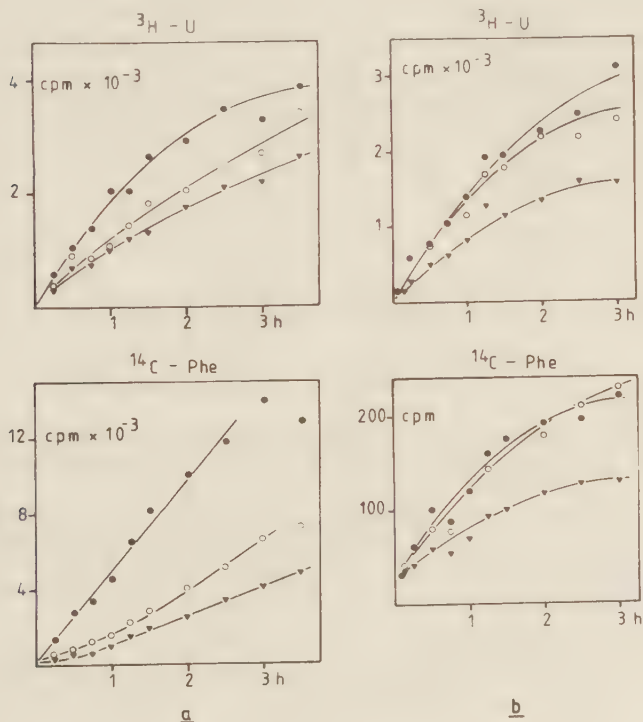


Abb.21: Hemmung der RNA- und Proteinsynthese durch Naphthochinon bei Aminosäure-Zugabe und -Mangel

Die Inkubation der EAT-Zellen erfolgte mit und ohne dem Aminosäuregemisch (nach 2.2.3.), jeweils ein Kontrollansatz ohne und 2 Ansätze mit Naphthochinon (nach 2.5.2.). Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

- a Zugabe des Aminosäuregemisches
b Aminosäuremangel
 ●-● Kontrollansätze ohne Naphthochinon
 ○-○ Naphthochinon 2,1 μM
 ▼-▼ Naphthochinon 2,8 μM

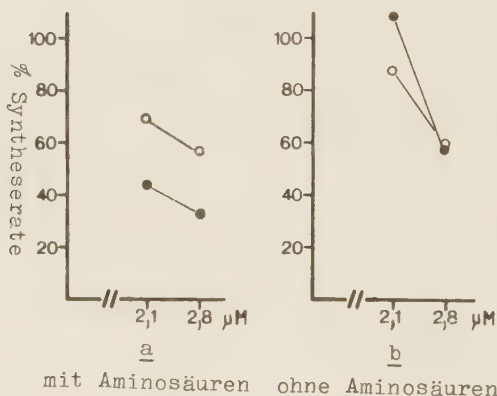


Abb.22: Vergleich der Einbauhemmung von Uridin und Phenylalanin durch Naphthochinon bei Aminosäure-Zugabe und -Mangel

Die Steigungen der Kontrolleinbaukurven (ohne Hemmstoff) aus Abb.21 wurden als 100 % gesetzt und die Steigungen der Einbaukurven mit Naphthochinon als Bruchteile davon angegeben. Die Steigungen wurden 75 Minuten nach Inkubationsbeginn der Abb.21 entnommen.

- a Zugabe des Aminosäuregemisches
b Aminosäuremangel
 ○-○ relative Steigung der Uridin-Einbaukurven
 ●-● relative Steigung der Phenylalanin-Einbaukurven

3.4.3. Beeinflussung des Thymidin-Einbaues durch Naphthochinon bei Inkubation der EAT-Zellen mit Aminosäuren

^3H -Thymidin wurde als Markierungsmolekül der DNA verwandt. Um einen Einfluß von Naphthochinon auf die DNA-Synthese zu untersuchen, wurden die EAT-Zellen mit ^3H -Thymidin inkubiert und die eingebaute Radioaktivität gemessen. Gleichzeitig wurden in Parallelansätzen die Zellen auch mit Uridin inkubiert, um eine unterschiedliche Wirkung beurteilen zu können. Alle Ansätze enthielten Aminosäure-Lösung. Das Ergebnis zwingt Abb.23. Auch der Thymidin-Einbau wird durch Naphthochinon konzentrationsabhängig gehemmt etwa gleich der Hemmung des Uridin-Einbaues; der Phenylalanin-Einbau wird etwas stärker gehemmt. Abb.24 zeigt die Steigungen der Einbaukurven in Prozentteilen der Kontrollansätze.

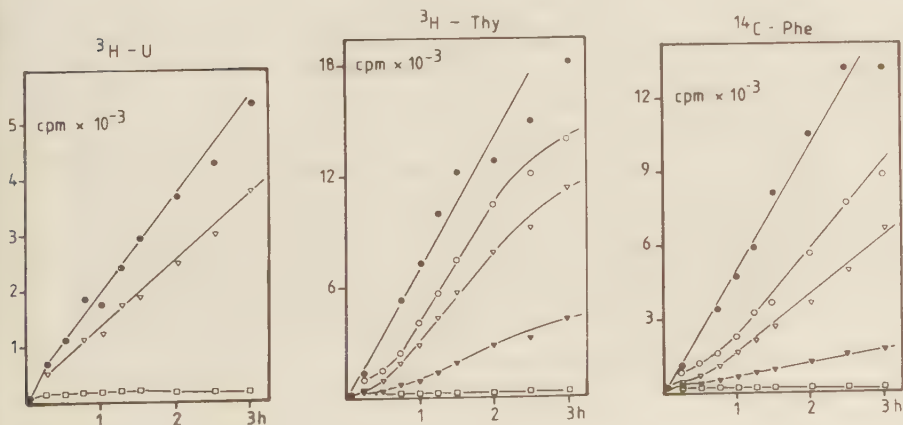


Abb.23: Vergleich der Wirkung von Naphthochinon auf den Einbau von Thymidin, Uridin und Phenylalanin im aminosäurehaltigen Medium

Die EAT-Zellen wurden in 3 Ansätzen mit Uridin und in 5 Ansätzen mit Thymidin inkubiert bei Zugabe von Aminosäuren (2.5.2.) und verschiedenen Naphthochinonkonzentrationen. Gemessen wurde (in Doppelmarkierungstechnik) der Einbau der radioaktiven Moleküle in säurefällbares Material als Maß der DNA-, RNA- und Proteinsynthese.

●-● Kontrollansätze ohne Hemmstoff

Naphthochinonkonzentrationen: ○-○ 0,7 μ M; ▽-▽ 1,4 μ M,
▼-▼ 2,1 μ M, □-□ 2,8 μ M

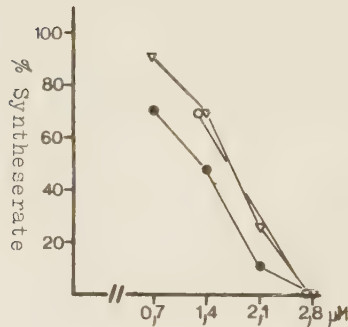


Abb. 24: Relative Hemmung des Einbaues von Thymidin, Uridin und Phenylalanin durch Naphthochinon im aminosäurehaltigen Medium

Die Steigungen der Einbaukurven aus Abb. 23 90 Minuten nach Inkubationsbeginn sind als Prozentwerte, bezogen auf die Steigungen der Kontrollkurven ohne Chinon, gegen die Naphthochinon-Konzentration aufgetragen.

▽-▽ relative Steigung der Thymidin-Einbaukurven
○-○ der Uridin-,
●-● der Phenylalanin-Einbaukurven

3.4.4. Einfluß von Naphthochinon auf den Thymidin-Einbau der EAT-Zellen bei Aminosäuremangel

Es wurde untersucht, ob die Wirkung von Naphthochinon auf den Thymidin-Einbau und damit die DNA-Synthese sich ändert, wenn die Zellen ohne Aminosäuren inkubiert werden. In zwei parallel laufenden Ansatzreihen wurden die EAT-Zellen mit Thymidin und Phenylalanin inkubiert, eine Reihe ohne und eine mit der Aminosäurelösung und jeweils mit Naphthochinon.

Im Aminosäuremangel wird im Kontrollansatz ohne Chinon weniger als die Hälfte an Thymidin eingebaut (der Phenylalanin-Einbau ist ohne Aminosäuren weit mehr gesenkt). Vergleicht man in Abb.25 die Einbauraten bei den einzelnen Naphthochinon-Konzentrationen mit den Kontrollansätzen, zeigt sich der Thymidin-Einbau bei Aminosäure-Gabe stärker gehemmt als im Aminosäuremangel; der Phenylalanin-Einbau ist ebenfalls bei Aminosäure-Gabe stärker gehemmt als im Aminosäuremangel. Während aber bei Aminosäure-Zugabe der Phenylalanin-Einbau stärker gehemmt ist als der Thymidin-Einbau, ist es im Aminosäuremangel umgekehrt: der Thymidin-Einbau ist hier stärker gehemmt. In Abb.26 sind die Steigungen der Einbaukurven angegeben, woraus sich die Umkehr der stärkeren Hemmung deutlich ablesen läßt.

In Gegenwart von Aminosäuren wird also durch Naphthochinon die Proteinsynthese früher bzw. stärker gehemmt als die RNA- und DNA-Synthese (siehe Abb.23 und 24); RNA- und DNA-Synthesehemmung sind nahezu identisch. In Abwesenheit von Aminosäuren dagegen ist die DNA-Synthese am meisten betroffen (Abb.21, 25, 26).

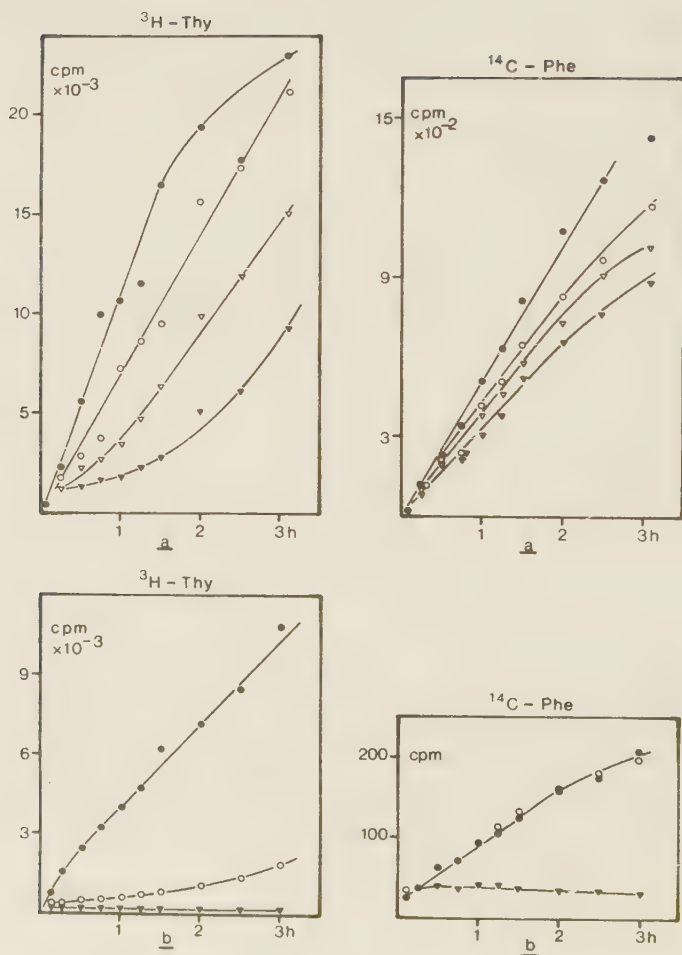


Abb.25: Wirkung von Naphthochinon auf den Thymidin-Einbau bei Aminosäure-Zugabe und -Mangel

Die EAT-Zellen wurden in 4 Ansätzen mit und in 4 Ansätzen ohne Aminosäurelösung inkubiert bei Zugabe von ^3H -Thymidin und ^{14}C -Phenylalanin (nach 2.5.2); jeweils ein Kontrollansatz ohne und 3 Ansätze mit Naphthochinon. Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Thymidin als Maß der DNA-Synthese und ^{14}C -Phenylalanin als Maß der Proteinsynthese in säurefällbares Material.

a Aminosäure-Zusatz

b Aminosäure-Mangel

Naphthochinon-Konzentration: o-o 0,7 μM , ∇ - ∇ 1,4 μM ,

$\blacktriangledown$ - $\blacktriangledown$ 2,1 μM

●-● Kontrollansätze ohne Hemmstoff

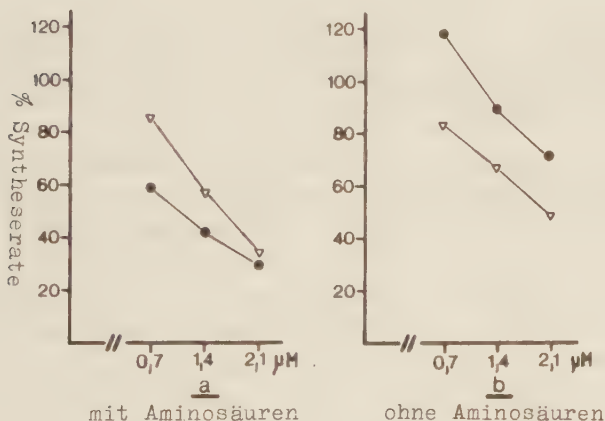


Abb.26: Vergleich der Einbauhemmung von Thymidin mit und ohne Aminosäuren

Die Steigungen der Einbaukurven aus Abb.25 sind als Prozentwerte der Steigungen der Kontrollansätze ohne Hemmstoff gegen die Naphthochinon-Konzentration aufgetragen; Zeitpunkt 90 Minuten nach Inkubationsbeginn.

a Ansätze mit Aminosäure-Lösung

b Ansätze ohne Aminosäuren

●-● Werte der Phenylalanin-Einbaukurven

∇ - ∇ Werte der Thymidin-Einbaukurven

3.5. Untersuchung von Chlorhydroxychinolin (CHC)

Dieser Stoff ist kein Chinon und fällt damit aus der hier untersuchten Stoffgruppe heraus. Er wurde aber trotzdem untersucht, da er wegen des Chinolin-Grundgerüsts und des Chloratoms am Benzolring eine Ähnlichkeit mit ACDOC aufweist (Formel siehe 2.1.5) und bei Bakterien als hemmend bekannt ist.

Chlorhydroxychinolin wird im folgenden mit CHC abgekürzt.

3.5.1. Einfluß von Chlorhydroxychinolin auf die RNA- und Protein-Synthese von ETA-Zellen bei Aminosäurezugabe und Aminosäuremangel

Die Wirkung von CHC auf den Einbau von Uridin und Phenylalanin wurde bei Inkubation der EAT-Zellen mit und ohne Aminosäurelösung untersucht. Zu den aminosäurehaltigen Ansätzen nach 2.5.2. wurde CHC als wässrige Suspension mit der Konzentration 1,5 mg/ml entspr. 8,4 mM zugegeben, zu den Ansätzen ohne Aminosäurelösung als wässrige Suspension mit der Konzentration 0,5 mg/ml entspr. 2,8 mM. Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material (Abb.27).

Bei Inkubation mit Aminosäuren wird der Uridin-Einbau nicht verringert durch CHC; der Phenylalanin-Einbau zeigt eine minimale Hemmung nach 150 Minuten (Abb.27a).

Bei Inkubation ohne Aminosäuren wird der Uridin-Einbau ebenfalls nicht verändert und der Phenylalanin-Einbau anscheinend stimuliert (Abb.27b).

Höhere Konzentrationen von CHC wurden nicht getestet, da dann unspezifische Effekte, d.h. unabhängig von der Molekülstruktur, allein aufgrund der Anwesenheit eines unphysiologischen Stoffes in hoher Konzentration in Betracht gezogen werden müßten.

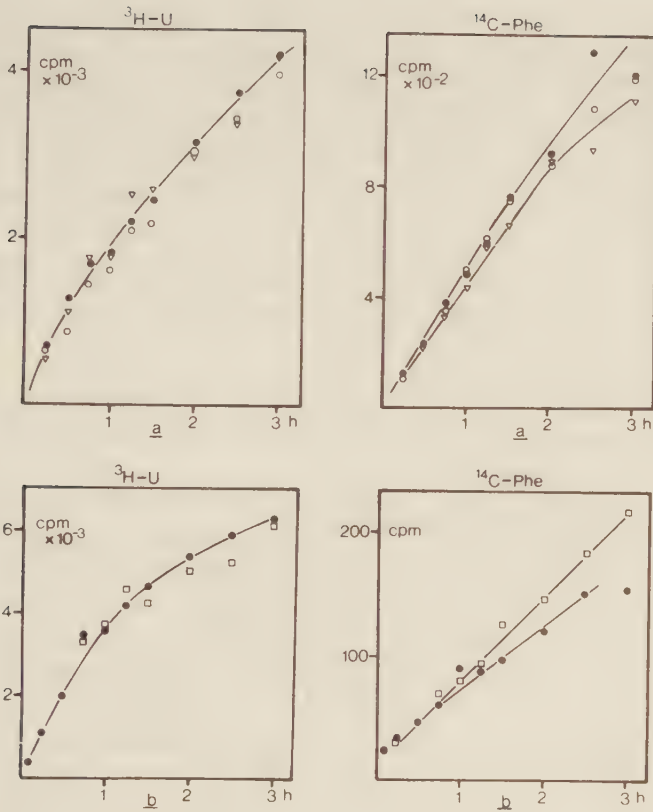


Abb.27: RNA- und Proteinsynthese bei Inkubation der EAT-Zellen mit Chlorhydroxychinolin

Dem Inkubationsmedium der EAT-Zellen nach 2.5.2. wurde Chlorhydroxychinolin als wässrige Suspension zugegeben und der Einbau von Uridin und Phenylalanin in säurefällbares Material gemessen.

a Aminosäurehaltiges Inkubationsmedium

●-● Kontrollansatz ohne CHC

○-○ CHC 215 μM ▽-▽ CHC 430 μM

b Inkubationsmedium ohne Aminosäuren

●-● Kontrollansatz ohne CHC

□-□ CHC 280 μM

3.6. Untersuchung von Menadion

2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion) wurde in seiner Eigenschaft als Derivat des Naphthochinons eingesetzt. Es wird auch als Vitamin K₃ bezeichnet, da es im menschlichen Organismus durch Anfügen einer Kohlenstoff-Seitenkette an C₃ zum wirksamen Vitamin K umgewandelt werden kann.

3.6.1. Wirkung von Menadion auf die RNA- und Proteinsynthese von EAT-Zellen bei Inkubation im aminosäurehaltigen Medium

Der Versuchsablauf bei der Untersuchung des Menadions war gegenüber den bis jetzt beschriebenen Einbauversuchen folgendermaßen abgeändert:

das Inkubationsmedium wurde nicht auf einzelne Reagenzröhrchen verteilt wie in 2.5.2. beschrieben, sondern für die Dauer der Zellinkubation im Ansatzgefäß belassen und für die jeweiligen Einbaustops zum vorgesehenen Zeitpunkt ein Aliquot mittels automatischer Pipette entnommen und in kalte 10 % TCA gespritzt. Nach einer Stunde wurden die einzelnen Proben über Membranfilter abfiltriert und im Szintillationszähler die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität gezählt (Einzelheiten siehe 2.5.3). Die Menge der eingesetzten Radioaktivität war ebenfalls verändert: die spezifische Radioaktivität des Phenylalanins betrug 2,5 Ci/Mol, die Konzentration 25 nCi/ml; die spezifische Radioaktivität des Uridins 395 Ci/Mol, die Konzentration 2,5 µCi/ml. Der Aufwand bei der Aufarbeitung der einzelnen Einbaustop-Proben war bei dieser Methode erheblich geringer, allerdings schwankten die Werte der gemessenen Radioaktivität, vor allem bei Uridin, mehr als bei der ersten Methode. Das Menadion wurde dem Inkubationsmedium als wässrige Lösung zugegeben, deren Herstellung in 2.1.7. beschrieben ist.

In Vorversuchen wurde diejenige Menadion-Konzentration ermittelt, die eine Hemmung des Uridin- und Phenylalanin-Einbaus bewirkt.

Abb.28 zeigt die Menadion-Wirkung im aminosäurehaltigen Inkubationsmedium. Wie bei den anderen Chinonen wird der Phenylalanin-Einbau zu einem früheren Zeitpunkt und im Vergleich zum Kontrollansatz stärker gehemmt als der Uridin-Einbau. In Abb.29 wird dies durch die unterschiedlichen Steigungen der Einbaukurven deutlich. Die größte Menadionkonzentration hemmt den Einbau fast völlig.

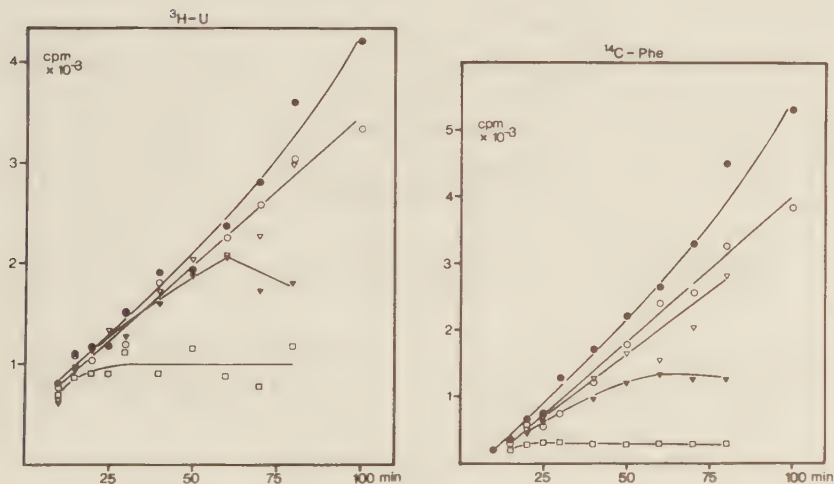


Abb.28: Wirkung von Menadion auf den Einbau von Uridin und Phenylalanin bei EAT-Zellen im aminosäurehaltigen Medium

Die Inkubation und Aufarbeitung der EAT-Zellen erfolgte nach der in 2.5.3 beschriebenen Methode: zu 3,4 ml Inkubationspuffer im Glaskölbchen (ohne und mit steigenden Menadionkonzentrationen) wurde zum Zeitpunkt 0 600 μl Zellsuspension zugesetzt und zu den jeweiligen Stop-Zeitpunkten

300 μ l des Inkubationsmediums in 7 ml TCA 10 % eiskalt pipettiert. Die einzelnen Entnahmeprobe wurden nach 1 Stunde über Membranfilter abfiltriert und die verbleibende Radioaktivität gemessen.

Die Abbildung zeigt den Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin bei verschiedenen Menadionkonzentrationen bei Aminosäure-Zugabe.

●-● Kontrollansatz ohne Menadion

Menadion-Konzentrationen: ○-○ 2,5 μM , ▼-▼ 2,8 μM ,

▼-▼ 3,8 μM , □-□ 6,3 μM

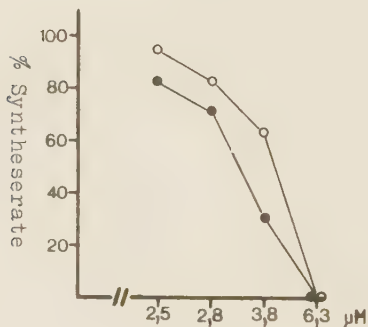


Abb.29: Vergleich der Einbauhemmung von Uridin und Phenylalanin durch Menadion.

Zum Zeitpunkt 50 Minuten nach Inkubationsbeginn wurden die Steigungen der Einbaukurven aus Abb.28 bestimmt und als Prozentwerte der Steigung der Kontrollansätze ohne Menadion gegen die Menadion-Konzentration aufgetragen.

○-○ Werte der Uridin-Einbaukurven

●-● Werte der Phenylalanin-Einbaukurven

3.7. Einfluß einzelner Aminosäuren auf die Einbauhemmung durch ACDOC

Die hemmende Wirkung von 3105 und Benzochinon auf den Einbau von ^3H -U und ^{14}C -Phe in säurefällbares Material ist im aminosäurefreien Einbaumedium stärker als bei Zugabe eines Aminosäure-Gemisches (siehe 3.2.2. und 3.4.2.). Eine wesentliche Verminderung bzw. Aufhebung der Hemmung läßt sich ebenfalls beim synthetischen Chinon ACDOC (siehe 2.1.1.) beobachten (34).

ACDOC wurde zuerst bei Bakterien (E.coli) eingesetzt und der Wirkungsmechanismus genauer untersucht. Die Aufhebung der Hemmwirkung von ACDOC durch ein Aminosäuregemisch konnte auf die Wirkung einer Aminosäure allein zurückgeführt werden, nämlich Leucin. Es konnte nachgewiesen werden, daß ACDOC bei E. coli die Leucin-tRNA-Synthese hemmt und dadurch die Proteinsynthese vermindert (31).

Durch Zugabe von nur jeweils einer Aminosäure des verwendeten Gemisches zum Inkubationsmedium sollte getestet werden, ob die Abschwächung der Chinonwirkung auch bei EAT-Zellen durch eine Aminosäure allein bewirkt wird oder ob das Gemisch als Ganzes wirksam ist.

Die folgenden Einbauversuche wurden durchgeführt wie in 2.5.2. beschrieben, die ACDOC-Lösung hergestellt nach 2.1.7..

3.7.1. Testung der einzelnen Aminosäuren

Als erste Aminosäure wurde Leucin auf einen abschwächenden Effekt auf die ACDOC-Wirkung untersucht. Im bisher verwandten Inkubationsgemisch mit Aminosäuren lag es in der Konzentration 174 μM vor. In dieser Konzentration wurde es nun als einzige Aminosäure - außer Phenylalanin - zum Inkubationsgemisch gegeben. Zum Vergleich wurden die EAT-Zellen auch in einem Medium inkubiert, welches das voll-

ständige Aminosäuregemisch nach 2.2.3. in der verringerten Konzentration 187 μM enthielt, also in der gleichen Konzentration wie Leucin allein. In dem sonst verwandten Inkubationsgemisch nach 2.5.2. ist die Gesamtkonzentration der Aminosäuren 1,88 mM. Die Einbauhemmung durch ACDOC wurde durch Leucin und das Aminosäuregemisch verringert, durch letzteres etwas mehr, bezogen auf die Einbauhemmung bei Zellinkubation ohne Aminosäuren. Es fällt auf, daß die absolute Menge des eingebauten radioaktiv markierten Phenylalanin viermal so groß ist im Ansatz mit dem Aminosäuregemisch als im Ansatz mit Leucin allein (Abb.30); Aminosäuregemisch im Inkubationsansatz erhöht drastisch die Einbauraten. Leucin alleine hat keinen Effekt.

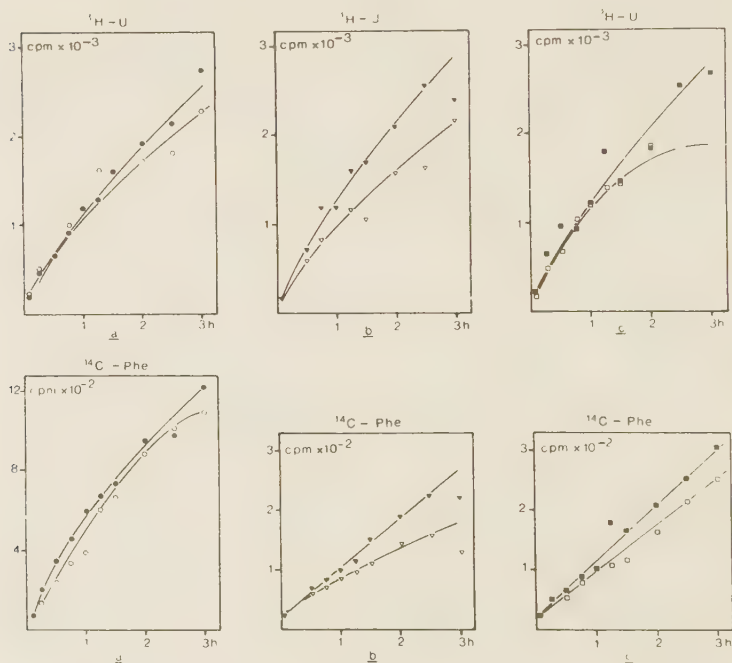


Abb.30: Zellinkubation ohne Aminosäuren, mit Aminosäuregemisch und mit Leucin bei Zugabe von ACDOC

Die EAT-Zellen wurden in 3 Varianten des Reaktionsansatzes nach 2.5.2. jeweils mit und ohne ACDOC inkubiert:

- a mit Aminosäuregemisch nach 2.2.3. in erniedrigter Konzentration von 188 μM aller Aminosäuren im Inkubationsmedium ●-● Kontrollansatz o-o mit ACDOC 5,2 μM
b ohne Aminosäuren (außer Phe) ▼-▼ Kontrollansatz
▼-▼ mit ACDOC 5,2 μM
c mit Leucin 174 μM ■-■ Kontrollansatz □-□ mit ACDOC 5,2 μM

Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

In gleicher Weise wie Leucin wurden Arginin und Tyrosin getestet. Im Inkubationsgemisch nach 2.5.2. mit Aminosäuregemisch sind diese ebenfalls in der Konzentration 174 μM enthalten und in dieser Konzentration wurden sie einzeln dem Inkubationsgemisch ohne Aminosäuren zugegeben, jeweils einem Ansatz mit und einem ohne ACDOC.

Das Ergebnis zeigt Abb.31. Im Vergleich mit den Kontrollansätzen ohne ACDOC ist bei Tyrosin-Zugabe die Einbauhemmung abgeschwächt, aber trotzdem vorhanden. Die geringste Wirkung zeigt ACDOC bei Zellinkubation ohne Aminosäuren-Zugabe; es sieht so aus, als ob einzelne Aminosäuren die Hemmung von ACDOC sogar verstärken. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann nicht gegeben werden.

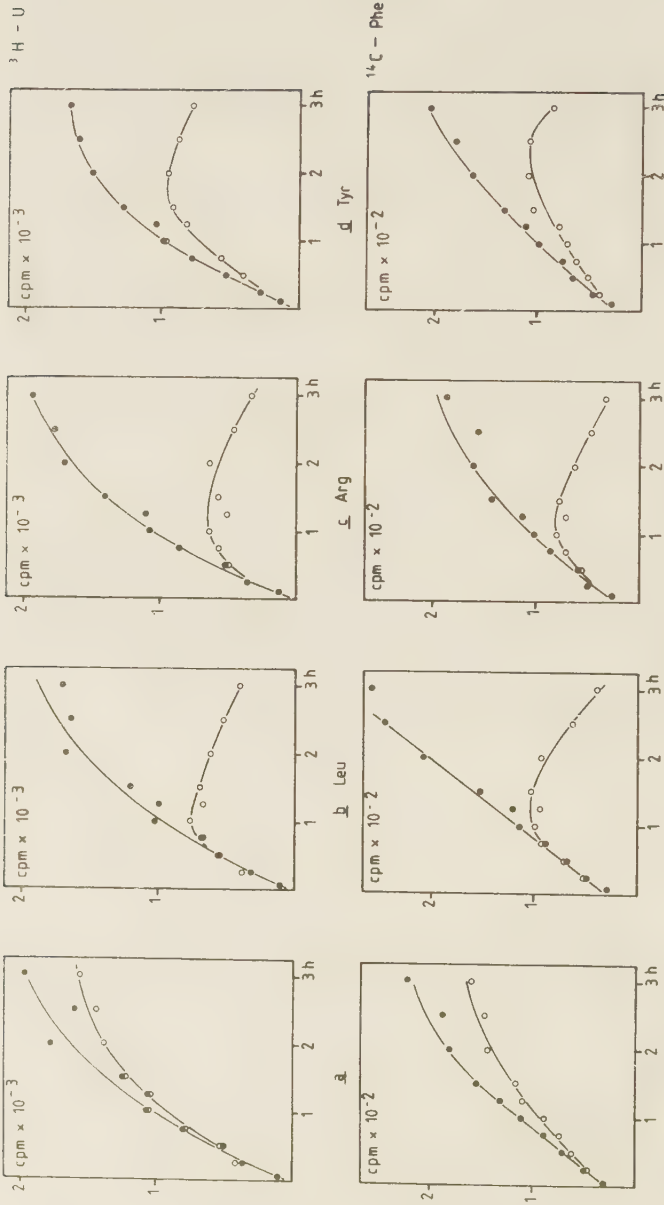


Abb.31: Zellinkubation mit Leucin, Arginin, Tyrosin und ohne Aminosäuren bei Zugabe von ACDOC.

Die EAT-Zellen wurden ohne Aminosäuregemisch inkubiert (siehe 2.5.2.) in 4 unterschiedlichen Medien:
a) ohne Aminosäuren
b) Zugabe von Leucin $174\text{ }\mu\text{M}$
c) Zugabe von Arginin $174\text{ }\mu\text{M}$
d) Zugabe von Tyrosin $174\text{ }\mu\text{M}$, jeweils ein Kontrollansatz ohne ACDOC (○-○) und ein Ansatz mit ACDOC $5,8\text{ }\mu\text{M}$ (●-●). Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

Je Aminosäure wurden bei den bisher untersuchten zwei Inkubationssätze benutzt: ein Ansatz mit der jeweiligen Aminosäure als Kontrollansatz ohne ACDOC und ein Ansatz mit ACDOC, um die Einbauhemmung durch ACDOC darzustellen, da die Hemmstoff-Zugabe der einzige Unterschied zwischen den beiden Ansätzen war.

Bei den weiteren Aminosäuren wurde der Kontrollansatz ohne ACDOC weggelassen, dadurch gestaltete sich die Untersuchung rationeller, d.h., es konnten mehr Aminosäuren gleichzeitig getestet werden. Zu den Inkubationsansätzen ohne Aminosäuren mit und ohne ACDOC als Maß der Einbauhemmung kommt je Aminosäure nur ein Ansatz mit ACDOC. Hat eine Aminosäure einen Effekt auf die Einbauhemmung durch das Chinon, bemerkt man diesen im Vergleich der Einbaukurven der anderen Aminosäuren und im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit aminosäurefreien Medium.

Abb.32 zeigt bei der beschriebenen Versuchsanordnung das Ergebnis bei Lysin, Methionin, Tryptophan, Threonin, Tyrosin und Valin. Sie lagen in dem Inkubationsmedium in erhöhter Konzentration von 500 μ M vor. Zu vergleichen sind die Einbaukurven der jeweiligen Aminosäuren bei ACDOC-Zugabe und die Einbaukurve des aminosäurefreien Mediums bei ACDOC-Zugabe.

Die Menge der eingebauten Radioaktivität und der Kurvenverlauf (starke Hemmung) sind durchweg ähnlich. Damit kann man annehmen, daß keine dieser Aminosäuren einen aufhebenden Effekt auf die Einbauhemmung (RNA- bzw. Proteinsynthese) hat.

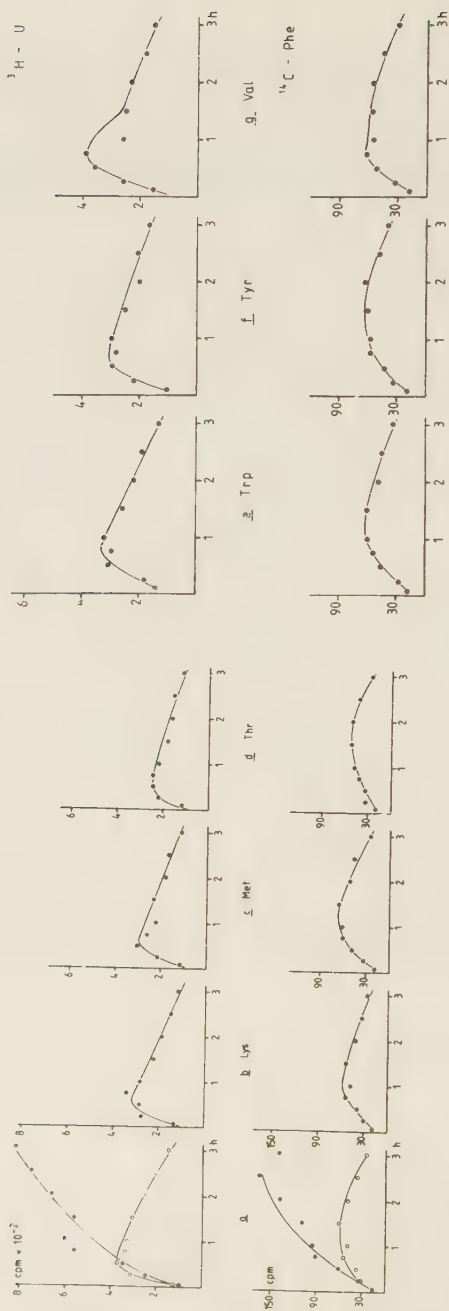


Abb. 32: Zellinkubation mit einzeln zugegebenen Aminosäuren des Aminosäuregemisches. Die Inkubationsansätze der EAT-Zellen wurden ohne Aminosäuregemisch angesetzt nach 2,5.2. und zu jedem Ansatz eine Aminosäure und ACDOC zugegeben. Als Vergleich wurden die Zellen ohne und mit ACDOC im aminosäurefreien Medium inkubiert.

a ohne Aminosäuren, ●-● ohne ACDOC o-o mit ACDOC b Zugabe von Lysin c Methionin d Threonin e Tryptophan f Tyrosin g Valin. Konzentration der jeweiligen Aminosäure 500 μM , von ACDOC 5,2 μM . Phenylalanin 10,5 μM war in allen Ansätzen als radioaktives Einbaumolekül enthalten (siehe 2.5.1). Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

Die Testung von Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Cystein und Glutamin zeigt Abb.33. Wie oben beschrieben, wurden die Zellen mit je einer Aminosäure und ACDOC inkubiert. Zur Beurteilung eines Einflusses auf die ACDOC-Wirkung dient der Vergleich mit der Einbaukurve der Zellinkubation ohne Aminosäuren mit ACDOC. Die Konzentration der Aminosäuren wurde mit jeweils 2 mM ebenso hoch gewählt wie die Gesamtkonzentration aller Aminosäuren bei Zugabe von 0,5 ml des Aminosäuregemisches nach 2.2.3. zum Inkubationsansatz.

Im Ansatz mit Glutamin und ACDOC (Abb.33 g/h) wird die dreifache Menge an ^{14}C -Phenylalanin eingebaut im Vergleich zum Ansatz ohne Aminosäuren mit ACDOC (Abb.33 b). Diese Effekt von Glutamin muß noch weiter untersucht werden (s.u.). Der Einbau von ^3H -Uridin wird durch die Glutamin-Zugabe nicht verändert gegenüber dem Vergleichsansatz (ohne Aminosäuren mit ACDOC). Die anderen der in diesem Versuch getesteten Aminosäuren haben keinen Effekt auf den Einbau von Uridin oder Phenylalanin, da sich die Einbaukurven nicht wesentlich von der des Vergleichsansatzes ohne Aminosäuren unterscheiden. Bei Histidinzugabe läuft die Proteinsynthese zwar über die ganze Versuchszeit kontinuierlich weiter, bleibt aber dennoch geringer als im Kontrollansatz (Ansatz ohne Aminosäuren mit ACDOC).

Glutamin zeigt demnach eine Wirkung auf den Einbau von Phenylalanin. Mehr läßt sich nicht aussagen, da bei diesem Versuchsaufbau die Zellen mit Glutamin und ACDOC inkubiert wurden und die Kontrolle, Zellinkubation mit Glutamin ohne ACDOC, fehlt. Es kann auch keine Verringerung der ACDOC-Wirkung durch Glutamin gefolgert werden.

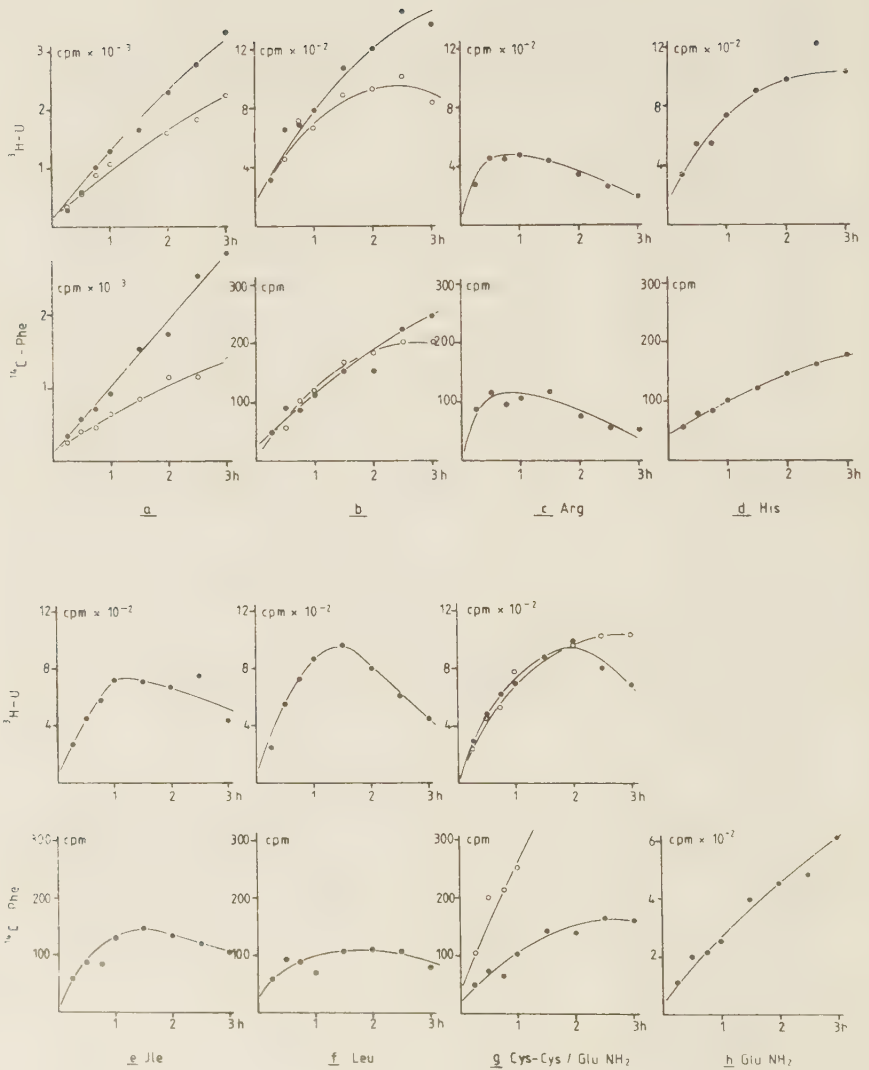


Abb.33: Zellinkubation mit einzeln zugegebenen Aminosäuren des Aminosäuregemisches

Abb. 33:

Die untersuchten Aminosäuren sind in dem Aminosäuregemisch nach 2.2.3. enthalten. Die EAT-Zellen wurden in Ansätzen nach 2.5.2. inkubiert, die jeweils eine der Aminosäuren und ACDOC enthielten.

Die EAT-Zellen wurden auch mit dem Aminosäuregemisch und ohne dieses inkubiert, letzteres dient zur Beurteilung des Einflusses der einzelnen Aminosäure. Gemessen wurde der Einbau von ^3H -Uridin und ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material.

a Zellinkubation mit Aminosäuregemisch

●-● ohne ACDOC o-o mit ACDOC

b Zellinkubation ohne Aminosäuren

●-● ohne ACDOC o-o mit ACDOC

c Zellinkubation mit Arginin

d mit Histidin

e mit Isoleucin

f mit Leucin

g mit Cystein ●-● und mit Glutamin o-o (in getrennten Ansätzen)

h mit Glutamin; ^{14}C -Phenylalanin-Einbau in gesonderter Darstellung.

Konzentration von ACDOC 5,2 μM

Konzentration der Aminosäuren: jeweils 2 mM.

Die unterschiedlichen Maßstäbe der Abszissen sind zu beachten.

3.7.2. Untersuchung des Einflusses von Glutamin auf die Protein- und RNA-Synthese der EAT-Zellen sowie auf die Hemmwirkung von ACDOC

Bei der Inkubation der EAT-Zellen mit den einzelnen Aminosäuren des Gemisches nach 2.2.3. und mit ACDOC zeigte nur Glutamin eine besondere Wirkung. Diese soll nun etwas näher charakterisiert werden.

Um die Wirkung des Glutamins auf die RNA- und Proteinsynthese darzustellen, wurden die Zellen mit Glutamin alleine inkubiert, Glutaminkonzentration 2 mM. Als Vergleich diente die Inkubation ohne Aminosäuren und mit dem Aminosäuregemisch nach 2.2.3., in dem Glutamin enthalten ist mit 435 μM im Ansatz. Das Ergebnis zeigt Abb.34. Der Uridin-Einbau wird

durch Glutamin kaum verstärkt im Vergleich zur Einbaukurve ohne Aminosäuren; alle Aminosäuren (Zugabe des Gemisches) verstärken den Uridin-Einbau deutlich, besonders bei längerer Inkubationsdauer (nach mehr als 90 Minuten). Der Einbau von Phenylalanin dagegen ist in Abwesenheit der übrigen Aminosäuren nur 10 % des Wertes mit Aminosäuren im Ansatz. Glutamin allein steigert den Phenylalanin-Einbau 5 - 8-fach. Glutamin hat also einen ausgeprägten fördernden Effekt auf den Einbau von Phenylalanin in säurefällbares Material.

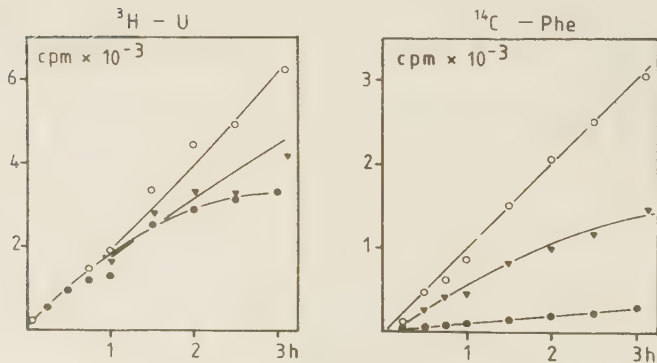


Abb.34: Vergleich der RNA- und Proteinsynthese ohne und mit Aminosäuren und mit Glutamin bei EAT-Zellen

Die EAT-Zellen wurden inkubiert wie in 2.5.2. beschrieben und der Einbau von ³H-Uridin und ¹⁴C-Phenylalanin in säurefällbares Material gemessen. Je ein Inkubationspuffer wurde angesetzt ohne Aminosäuregemisch, mit Glutamin allein, Konzentration 2 mM, und mit dem Aminosäuregemisch nach 2.2.3., das auch Glutamin enthält mit 435 µM im Ansatz.

- Zellinkubation mit Aminosäuregemisch (Gesamtkonzentration der Aminosäuren 1,88 mM)
- ▼-▼ mit Glutamin 2mM
- ohne Aminosäuren

Eine Wirkung von Glutamin auf die Einbauhemmung durch ACDOC ließ sich nachweisen durch den Vergleich der Hemmkurven des Chinons aller essentiellen Aminosäuren (nach Eagle, 44), bei Aminosäuremangel und bei Glutaminzugabe. Das Inkubationsmedium der EAT-Zellen wurde daher 4-fach variiert: 1. Zugabe des Gemisches essentieller Aminosäuren nach 2.2.3.; 2. Zugabe dieses Gemisches, dem aber Glutamin fehlte; 3. Zugabe von Glutamin alleine; 4. keine Aminosäurezugabe. Die Konzentration des einzeln zugegebenen Glutamins entsprach mit $435 \mu\text{M}$ auch der Konzentration, in der es bei Zugabe des vollständigen Aminosäuregemisches im Inkubationsmedium vorliegt. Die Zellen wurden jeweils mit und ohne ACDOC inkubiert (Abb.35). Die stärkste und besonders früh einsetzende Hemmung der Proteinsynthese durch ACDOC findet sich bei Zellinkubation mit dem Gemisch aus 11 Aminosäuren, dem Glutamin fehlt. Im aminosäurefreien Medium ist die Proteinsynthese durch ACDOC auch stark vermindert, die Hemmung setzt jedoch deutlich erst nach über einer Stunde ein. Bei Zugabe des vollständigen Aminosäuregemisches ist erst nach 2 Stunden eine starke Hemmwirkung zu beobachten. Glutaminzugabe alleine verzögert das Einsetzen der Proteinsynthesehemmung ebenso wie das Gesamtgemisch der Aminosäuren. Insgesamt scheint auch Glutamin die Hemmwirkung von ACDOC nicht aufzuheben; es hat höchstens einen verzögernden Effekt. Eine endgültige Interpretation dieser Versuche erscheint jedoch schwierig, da Glutamin und das Aminosäuregemisch auch auf die Kontrollzellen eine allgemeine stimulierende Wirkung ausüben (Erhöhung des Phenylalanin-Einbaues).

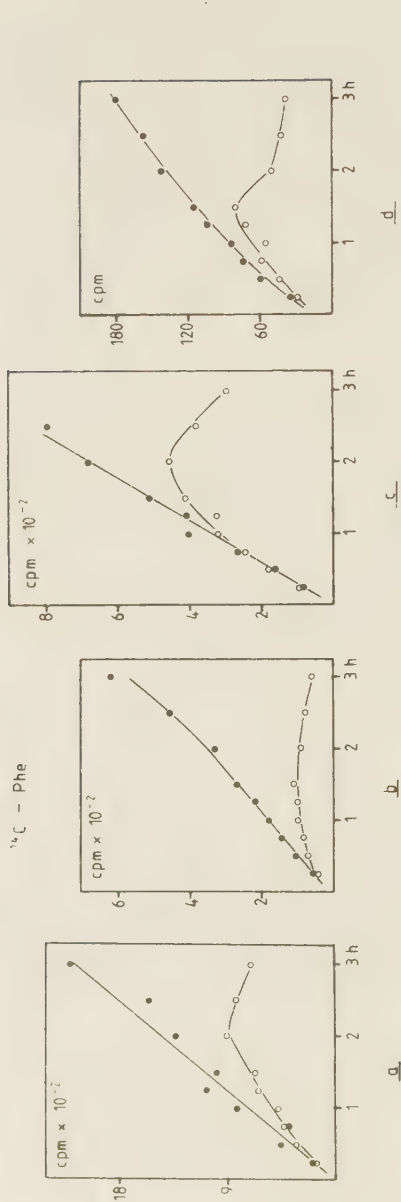


Abb. 35: Einfluß von Glutamin auf die Wirkung von ACDOC bei der Proteinsynthese der EAT-Zellen

Die EAT-Zellen wurden nach 2.5.2. inkubiert und der Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in säurefällbares Material gemessen. Die Zugabe von Aminosäuren zum Inkubationspuffer wurde wie folgt variiert:

- a Zugabe des Aminosäuregemisches nach 2.2.3., Gesamtkonzentration der Aminosäuren 1,88 mM
 - b Zugabe des gleichen Gemisches ohne Glutamin, Gesamtkonzentration der Aminosäuren 1,84 mM
 - c Zugabe von Glutamin 435 μM
 - d Inkubationsmedium ohne Aminosäuren
- Die Zellen wurden jeweils ohne Hemmstoff (●-●) und mit ACDOC 4,2 μM (○-○) inkubiert.

Glutamin besitzt 2 typische Molekülstrukturen : es ist ein Säureamid und eine Aminosäure.

Daher sollte auch die zugrunde liegende Struktur, also Glutaminsäure, eingesetzt werden und Asparagin als entsprechendes Säureamid. Im Aminosäuregemisch nach 2.2.3. sind Glutaminsäure, Asparagin und Asparaginsäure nicht enthalten.

Abb.36 zeigt die RNA- und Proteinsynthese bei Inkubation der EAT-Zellen mit den Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin und Asparaginsäure, jeweils in der Konzentration 435 μM im Medium, und ohne Aminosäurezusatz. Die Zellen wurden jeweils mit und ohne ACDOC inkubiert.

Nimmt man den Ansatz ohne Aminosäuren als Vergleichsgrundlage, beträgt die Proteinsynthese bei Glutamin-Zugabe fast das 5-fache, bei Asparagin-Zugabe das 1,5-fache und wird von Glutaminsäure und Asparaginsäure nicht erhöht. Die RNA-Synthese wird durch die Aminosäuren nur wenig verstärkt: von Glutamin auf das 1,5-fache, von den restlichen geringer. Die hemmende Wirkung von ACDOC ist bei allen Ansätzen gleich, allerdings ist bei Glutamin-Zugabe wegen der stark erhöhten Proteinsynthese eine vergleichende Aussage unsicher.

Neben der bereits festgestellten Wirkung von Glutamin zeigt nur das zweite Säureamid Asparagin eine geringe Wirkung auf die Proteinsynthese. Die Wirkung von ACDOC beeinflusst Asparagin nicht.

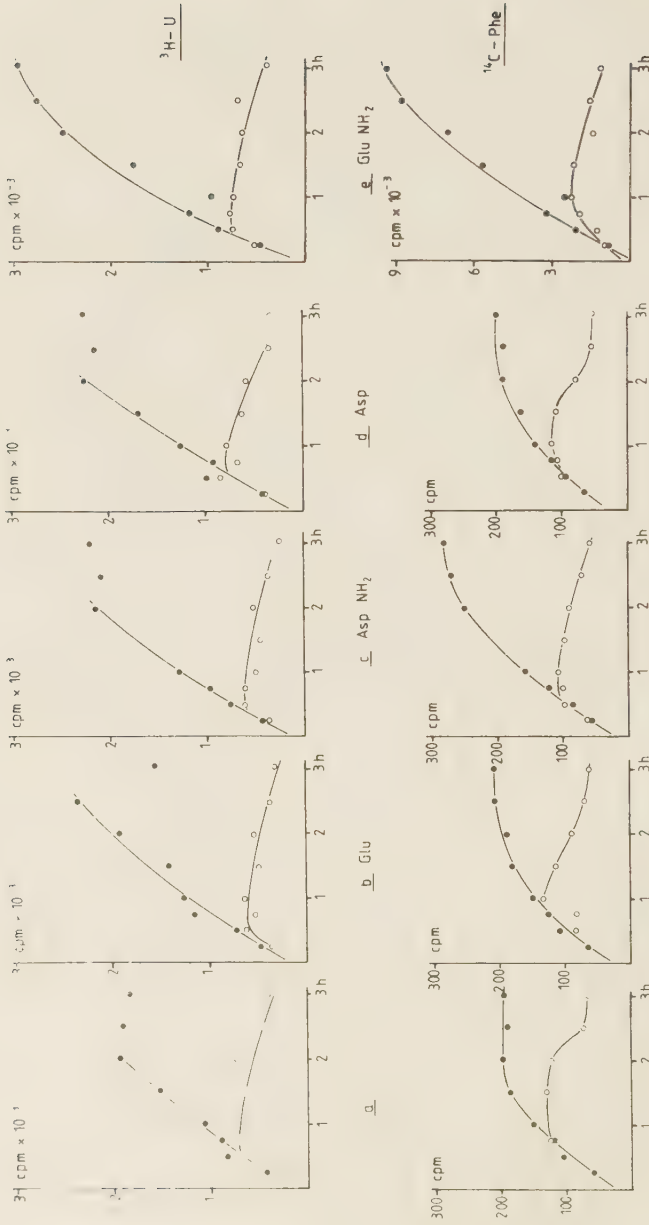
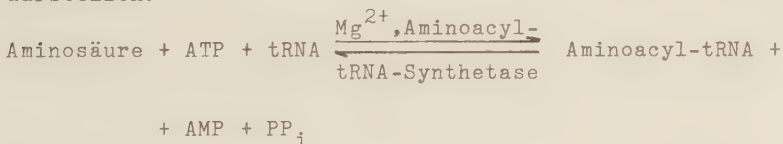


Abb. 35: Wirkung von ACDOC bei Zugabe von Asparaginsäure, Glutaminsäure und deren Säureamide. Die EAT-Zellen wurden jeweils mit einer Aminosäure mit und ohne ACDOC inkubiert wie in 2.5.2. angegeben und der Einbau von $^3\text{H-Uridin}$ und $^{14}\text{C-Phenylalanin}$ in säurefällbares Material gemessen. a aminosäurefreies Inkubationsmedium b Zugabe von Glutaminsäure c Zugabe von Asparagin d Zugabe von Asparaginsäure e Zugabe von Glutamin. Konzentration der Aminosäuren: jeweils $735 \mu\text{M}$, ●● Zellinkubation ohne Hemmstoff, ○○ mit ACDOC $4,4 \mu\text{M}$

3.8. Hemmbarkeit der Leucyl-tRNA-Synthetase durch ACDOC und Naphthochinon in vitro

Wie früher beschrieben, ist bei *E. coli* der Angriffsort des ACDOC die Leucyl-tRNA-Synthetase. Ob dies auch für die Hemmung der Protein- und Nukleinsäuresynthese bei EAT-Zellen gilt, wurde ebenfalls untersucht (35). Im Rahmen jener Arbeit wurde auch ein System zur Aminoacylierung von tRNA aus EAT-Zellen in vitro erarbeitet und mit einigen Aminosäuren, hauptsächlich Leucin, durchgeführt. Unter anderem wurde gezeigt, daß ACDOC die Leucyl-tRNA-Synthetase hemmen kann. Hier sollte untersucht werden, ob auch Naphthochinon dazu in der Lage ist.

Das angewandte In-Vitro-System der tRNA-Beladung ist detailliert beschrieben bei U. Huschka (35) und soll hier nur in den Grundzügen dargelegt werden. Die enzymatische Reaktion läßt sich vereinfacht in folgender Gleichung darstellen:



Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen werden nicht rein, sondern als Bestandteil eines Zellrohextraktes eingesetzt. Dieser Zellrohextrakt (= "Enzymrohextrakt") entsteht aus EAT-Zellen, die mittels Ultraschall aufgeschlossen und bei 20 000 xg zentrifugiert werden. Der Überstand enthält die Synthetasen.

Für die Untersuchung von Chinonwirkungen ist wichtig, daß der Präparationspuffer keine inaktivierenden Substanzen wie Mercaptoäthanol o.ä. enthält (38).

Die tRNA wurde in einem Verfahren ähnlich wie bei Taylor et al. (49) und Jacobson et al. (50) präpariert. Sie wurde in einem Äthanol-KAc-Gemisch bei -18°C aufbewahrt, bei Bedarf abzentrifugiert und der trockene Niederschlag in Wasser gelöst mit einer Konzentration von ca. 30 OD₂₆₀/ml H₂O.

In einem entsprechenden Reaktionsansatz, der Enzymrohextrakt, tRNA-Gemisch, Mg^{2+} -ATP und eine radioaktiv markierte Aminosäure enthält, wird durch Enzymaktivität Aminoacyl-tRNA gebildet, welche durch Säure ausfällbar ist und so von der nicht säurefällbaren radioaktiven Aminosäure getrennt werden kann. Im Flüssigkeitsszintillationszähler wird über die gemessene Radioaktivität die Menge der beladenen tRNA bestimmt.

Als Enzymaktivität gilt die Anfangsgeschwindigkeit der Aminoacylierung, d.h. die Zunahme der fällbaren Radioaktivität aufgetragen gegen die Zeit unmittelbar nach Start der Reaktion. Wird in einem Reaktionsansatz die Aktivität der Aminoacyl-tRNA-Synthetase durch einen Hemmstoff verringert, kann der Grad der Hemmung im Vergleich zu einem Kontrollansatz an der verringerten Menge der säurefällbaren Radioaktivität gemessen werden.

3.8.1. Hemmung der Leucyl-tRNA-Synthetase (EC 6.1.1.4.) aus EAT-Zellen durch ACDOC und Naphthochinon

Die Hemmung der Leucyl-tRNA-Synthetase durch die Hemmstoffe zeigt Abb.37. ACDOC in einer Konzentration von 9 μM im Reaktionsansatz bewirkt keine Verringerung der Enzymaktivität, bei 48 μM verringert sie sich auf 40 % des Kontrollansatzes. Durch 1,4-Naphthochinon wird das Enzym wesentlich stärker gehemmt; bei 8 μM Naphthochinon-Konzentration verringert sich die Enzymaktivität auf 66 %, bei 40 μM und 80 μM wird das Enzym völlig gehemmt.

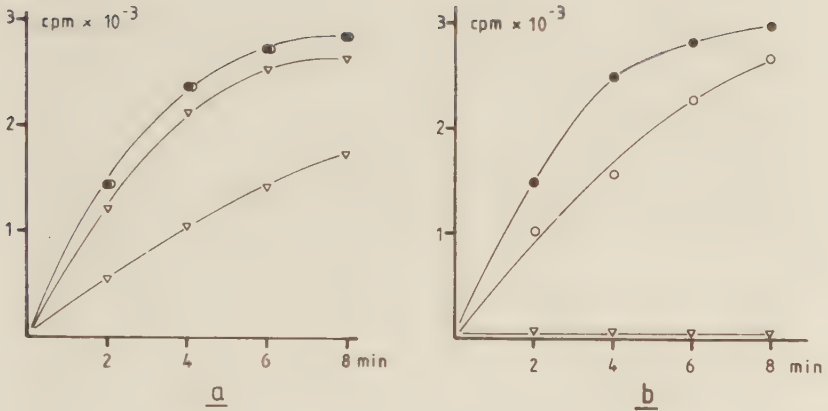


Abb.37: Hemmung der Leucyl-tRNA-Synthetase durch ACDOC und Naphthochinon

In HEPES-Puffer wurde der Enzymrohextrakt mit ACDOC bzw. Naphthochinon 5 Minuten bei 25° C vorinkubiert und dann die Reaktion mit ATP gestartet. Nach jeweils 2 Minuten ab Reaktionsstart wurden 50 μ l aus dem Reaktionsansatz (250 μ l) entnommen und die säurefällbare Aktivität gemessen.

a Vorinkubation mit ACDOC

b Vorinkubation mit 1,4-Naphthochinon

a
 ●-● Kontrollansatz
 ○-○ ACDOC 9,6 μ M
 △-△ ACDOC 28,8 μ M
 ▲-▲ ACDOC 48 μ M

b
 ●-● Kontrollansatz
 ○-○ Naphthochinon 8 μ M
 △-△ Naphthochinon 40 bzw. 80 μ M

4. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war eine vergleichende Untersuchung der Wirkungen zytostatischer Chinone auf die Makromolekülsynthese (DNA, RNA, Protein) von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (Zellen eines Mäusetumors), die in vitro in einem synthetischen Puffermilieu jeweils mit oder ohne Aminosäuren inkubiert wurden. Die Ergebnisse sollten zur Beantwortung der Frage beitragen, ob dem Chinonring eine allgemeine und eventuell gleichartige Hemmfunktion zugesprochen werden kann, wie in der Literatur vermutet worden ist.

Bei Zellinkubation in synthetischem Medium wurden die RNA-, DNA- und Proteinsynthesen gemessen durch den Einbau von radioaktiv markiertem Uridin, Thymidin und Phenylalanin. Es wurden untersucht die Chinone 6-Amino-7-chlor-5,8-dioxochinolin (ACDOC), 6-Amino-5,8-dioxo-7-thiomethylchinolin ("3105"), p-Benzochinon, 1,4-Naphthochinon, 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion) und das Chinolin 5-Chlor-8-hydroxychinolin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß alle getesteten Chinone bei geeigneter Konzentration die Syntheseraten aller Makromoleküle hemmen können, die einzelnen Syntheseraten jedoch unterschiedlich stark betroffen sind. Werden die Chinone untereinander verglichen in ihrer Hemmwirkung auf die einzelnen Syntheseraten, ergeben sich deutliche Unterschiede, die der Hypothese eines gemeinsamen Hemmechanismus widersprechen.

Im aminosäurehaltigen Medium hemmen ACDOC, Naphthochinon und Menadion primär und am stärksten die Proteinsynthese, 3105 und Benzochinon primär die DNA-Synthese.

Im aminosäurefreien Medium wird am stärksten gehemmt durch ACDOC und 3105 die Proteinsynthese, durch Benzochinon und Naphthochinon die DNA-Synthese. Die hemmende Wirkung von Naphthochinon ist ohne Aminosäuren schwächer als bei Aminosäurezugabe, bei den restlichen Chinonen ist es umgekehrt.

Insgesamt wird in Gegenwart von Aminosäuren bei allen Chinonen eine stärkere Hemmung der Proteinsynthese gegenüber der RNA-Synthese beobachtet. Die DNA-Synthese ist einmal stärker und einmal schwächer betroffen als die Proteinsynthese.

Der Konzentrationsbereich der Chinone, in dem die Makromolekülsynthese nur teilweise gehemmt wird, ist sehr eng und für die untersuchten Chinone fast gleich; auffällig ist, daß bis zu einer Schwellenkonzentration die Chinone keinerlei Wirkung entfalten.

Das bakteriostatische Chinolin CHC zeigte auch bei hoher Konzentration keine Wirkung auf die Tumorzellen.

Es muß geschlossen werden, daß die untersuchten Chinone über unterschiedliche molekulare Mechanismen zytostatisch wirken. Die Ergebnisse mit dem nicht-chinoiden Molekül Chlorhydroxychinolin, das keine Wirkung zeigt, deuten darauf hin, daß der Chinonstruktur in den als zytostatisch gefundenen Molekülen eine essentielle Rolle bei der Hemmfunktion zukommt. Weitere Molekülstrukturen scheinen das Wirkungsspektrum zu modifizieren oder andere zusätzliche Hemmfunktionen auszuüben.

5. Diskussion

Die Aufklärung des molekularen Wirkungsmechanismus einer biologisch aktiven Substanz, z.B. eines Hemmstoffes wie Mitomycin oder Granaticin, wird immer die Frage aufwerfen, ob eine bestimmte Molekülstruktur dieser Substanz für die Wirkung verantwortlich ist. Als bei der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Granaticin und ACDOC bei Bakterien durch die Arbeitsgruppe Ogilvie der gleiche Mechanismus aufgezeigt werden konnte (Hemmung der Leucyl-tRNA-Synthetase), ergab sich die Frage nach der Chinonstruktur als wirksamem Prinzip im Sinne eines Struktur-Wirkungsmechanismus. ACDOC erwies sich auch bei Eukaryonten (EAT-Zellen) als wirksamer Hemmstoff des Stoffwechsels (34).

Grundlage dieser Arbeit bildeten die Untersuchungen von ACDOC und anderen Chinonen an Bakterien und von ACDOC an EAT-Zellen (Übersichtsdarstellungen: 25,38). Wenn die Chinonstruktur von ACDOC und der anderen Hemmstoffe das wirksame Prinzip ist, könnte man bei anderen Chinonen gleiche oder ähnliche Wirkungen erwarten. 4 Chinone und ein Chinolin wurden daher auf ihre Wirkung auf EAT-Zellen untersucht, d.h. ihr Einfluß auf die Protein-, DNA- und RNA-Synthese bei Zellinkubation in einem synthetischen Medium gemessen.

Die untersuchten Stoffe waren: das Chinolinchinon "3105" wegen der Ähnlichkeit zu ACDOC; p-Benzochinon als das einfachste Chinon überhaupt; Naphthochinon als einfachstes Doppelringchinon; Menadion als Vitamin-K-Agonist und Naphthochinon-Derivat. Als "Negativ-Beispiel" wurde Chlorhydroxychinolin untersucht. Es ist kein Chinon, aber das Molekül ähnelt ACDOC durch das Chinolingerüst, das Chloratom und das Sauerstoffatom (OH-Gruppe) an einem Ring. CHC wirkt bakteriostatisch. Von den Chinonen wurden gesättigte wässrige Lösungen verwendet, von CHC eine Suspension in Wasser.

Die gewaschenen EAT-Zellen wurden in einem rein synthetischen Medium mit den obigen Hemmstoffen inkubiert und die DNA-, RNA- und Proteinsynthese gemessen durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uridin und Phenylalanin in säurefällbares Material. Die Hemmstoffwirkung wurde - außer bei Menadion - untersucht ohne und mit Zugabe eines Gemisches essentieller Aminosäuren. Bei der Zellinkubation mit Chinon wurde als deren Hemmwirkung eine Verringerung des Einbaues der radioaktiven Vorstufen verstanden im Vergleich zu Zellen ohne Chinonzusatz.

Während der Inkubationszeit wird zu festgelegten Zeitpunkten der Zellstoffwechsel in jeweils gleichen Anteilen des Inkubationsansatzes beendet (= einzelne Einbaustops) und aus den Wertepaaren gefällte Radioaktivität-Inkubationszeit eine Einbaukinetik ermittelt. Diese ist im besten Fall linear als Zeichen eines gleichmäßigen Zellstoffwechsels. Unter Chinoneinfluß können die Kinetiken ebenfalls linear sein, zeigen aber meist ein konvexes Kurvenbild und können waagrecht auslaufen als Zeichen der völligen Stoffwechselhemmung oder sogar sinken bei Zell-Lyse. Bei willkürlicher Festsetzung der Steigung der Kontrolleinkubationskurven zu 100 % (Zellinkubation ohne Chinon) wurde als versuchsunabhängiges Maß der Stoffwechselhemmung die relative Erniedrigung der Steigungen der Einbaukurven herangezogen.

Sowohl im aminosäurehaltigen wie auch im (bis auf Phenylalanin) aminosäurefreien Medium ließ sich eine kontinuierliche Protein-, DNA- und RNA-Synthese auch über die längste Versuchszeit (mehr als 3 Stunden) verfolgen. Im aminosäurefreien Medium war allerdings die eingebaute Radioaktivität des Uridins auf durchschnittlich 75 %, die des Thymidins auf 50 % und die des Phenylalanins auf 15 % gegenüber den Werten bei Aminosäurezugabe reduziert.

Alle untersuchten Chinone können die Makromolekülsynthese in EAT-Zellen konzentrationsabhängig teilweise oder ganz hemmen. Die Ergebnisse im einzelnen:

3105 hemmt im aminosäurehaltigen Medium die DNA-Synthese im Inkubationsverlauf früher und stärker als die Proteinsynthese und diese wiederum früher und stärker als die RNA-Synthese. Bei Zellinkubation ohne Aminosäuren ist die Wirkung auf RNA- und Proteinsynthese im Vergleich zum aminosäurehaltigen Medium nur sehr gering verstärkt.

p-Benzochinon hemmt in Anwesenheit von Aminosäuren die Proteinsynthese stärker und zeitlich früher als die RNA-Synthese; die DNA-Synthese ist bei niedriger Benzochinonkonzentration weniger, bei höherer mehr betroffen als die beiden vorgenannten. Außerdem zeigt der Thymidineinbau eine Art Erholung nach etwa 90 Minuten. Im Aminosäuremangel zeigen sich die Zellen sehr viel empfindlicher für Benzochinon, besonders die DNA-Synthese.

1,4-Naphthochinon hemmt im aminosäurehaltigen Medium die Proteinsynthese nach Inkubationsbeginn früher und insgesamt stärker als die RNA-Synthese; letztgenannte und die DNA-Synthese werden gleich beeinflusst. Im Aminosäuremangel dagegen werden die DNA- und RNA-Synthesen mehr gehemmt als die Proteinsynthese.

Menadion hemmt im aminosäurehaltigen Medium die Proteinsynthese früher und stärker als die RNA-Synthese.

Chlorhydroxychinolin beeinträchtigt die Makromolekülsynthese nur minimal. Obwohl es in der im Vergleich zu den Chinonen hohen Konzentration von 430 μM im Inkubationsmedium enthalten war (zugegeben als Suspension in Wasser), hemmt es im aminosäurehaltigen Medium die Proteinsynthese sehr gering, im Aminosäuremangel scheint sie leicht stimuliert zu sein. Die RNA-Synthese wird nicht beeinflusst. Bei Bakterien allerdings zeigte sich CHC als gut wirksam.

Zur Hemmung des Zellstoffwechsels genügten geringe Konzentrationen der Chinone, die durch Zugabe kleiner Volumina der gesättigten wässrigen Lösungen zum Inkubationspuffer erreicht werden konnten, obwohl bis auf Benzochinon die untersuchten Chinone schlecht wasserlöslich sind. Sehr eng ist der Konzentrationsbereich der Chinone, in dem eine abge-

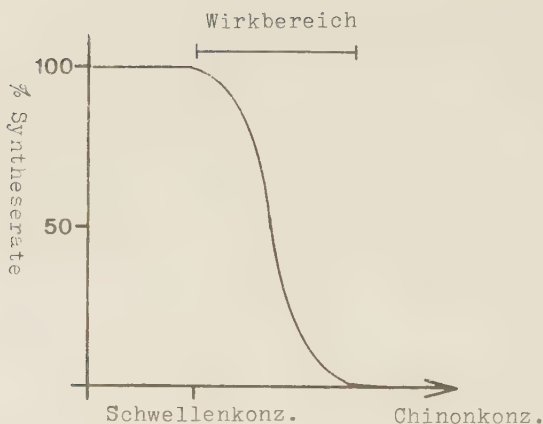
stufte Hemmung zu erzielen ist, nur bei Benzochinon ist er etwas größer (siehe Tabelle). Es scheint eine Schwellenkonzentration zu bestehen, sozusagen eine minimale Hemmkonzentration, da bei Zellinkubation mit einer Chinonkonzentration unter diesem Wert auch nach längerer Zeit (mehr als 2 Stunden) keine Hemmung eintritt, bei der kleinsten wirksamen Konzentration die Proteinsynthesehemmung aber innerhalb einer Stunde nachzuweisen ist. Als obere Grenze dieses Bereiches wird hier die Konzentration betrachtet, bei der nach 30 Minuten eine totale Hemmung eintritt. Aus diesen Zahlen kann aber nicht auf einen gleichartigen Wirkungsmechanismus geschlossen werden.

Konzentrationsbereiche der Chinone, in denen in Gegenwart von Aminosäuren eine abgestufte Hemmung der Proteinsynthese zu erzielen war:

Hemmstoff	"minimale Hemmkonzentration"	50 % Synthesehemmung	obere Grenze ¹⁾
ACDOC	3,0 µM	5,2 µM	6,3 µM
3105	3,3 µM	5,6 µM	6,7 µM
p-Benzochinon	3,2 µM	16 µM	32 µM
1,4-Naphthochinon	0,7 µM	1,4 µM	2,8 µM
Menadion	2,5 µM	3,3 µM	6,3 µM

¹⁾ totale Hemmung der Proteinsynthese nach 30 Minuten Inkubation in Gegenwart von Aminosäuren.

Faßt man die Abhängigkeit der Synthesehemmung von der Chinonkonzentration aller hier unternommenen Versuche zusammen, ergibt sich ein Kurvenverlauf wie in folgender Abbildung dargestellt.



Aus dieser Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung kann man die Vermutung ableiten, daß erst eine gewisse Konzentration der lipophilen Chinone in der Membran erreicht werden muß, bevor intrazelluläre Wirkungen auftreten. Bei der Hemmung der gereinigten Leucyl-tRNA-Synthetase wurde dieser Schwellenwert nicht gesehen (31).

Alle 4 Chinone erwiesen sich wie ACDOC als potente Inhibitoren des Zellstoffwechsels bei EAT-Zellen. Sie alle hemmen bei Zellinkubation mit Aminosäuren die Proteinsynthese zeitlich früher und stärker als die RNA-Synthese. Unterschiede bestehen in der Wirkung auf die DNA-Synthese und im Aminosäuremangel. Man muß also verschiedene Angriffspunkte auf molekularer Ebene vermuten. Ob die untersuchten Chinone primär an einer tRNA-Synthetase angreifen wie das für ACDOC bei *E. coli* nachgewiesen wurde (31), ist nicht wahrscheinlich. Bei der Untersuchung des Beladungszustandes der tRNAs in EAT-Zellen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen wurde in ACDOC-behandelten Zellen keine Unterbeladung der Leucyl-tRNA nachgewiesen. Die Leucyl-tRNA-Synthetase war *in vitro* durch ACDOC zwar hemmbar, in

ganzen Zellen konnte dieser Mechanismus als Ursache der Proteinsynthesehemmung somit aber nicht bestätigt werden (35).

Das untersuchte Chlorhydroxychinolin zeigte fast keine Wirkung, obwohl es in der 100-fachen Konzentration im Inkubationspuffer enthalten war, bei der z.B. 3105 wirkt. CHC hat allerdings auch die geringste Löslichkeit in Wasser der untersuchten Stoffe; zum Inkubationspuffer wurde es als Suspension zugesetzt. Die zugegebene Menge reichte aber aus, um eine gesättigte Lösung im Medium zu erzeugen, deren Konzentration ($55 \mu\text{M}$) liegt aber über dem 10-fachen einer wirksamen 3105-Konzentration. Die Wirkungslosigkeit von CHC deutet auf eine essentielle Wirkung der Chinonstruktur hin.

Die unterschiedlichen Wirkungsspektren der untersuchten Chinone können dann durch die anderen verschiedenen Molekülstrukturen verursacht sein. Es soll aber betont werden, daß CHC gegen Bakterien wirksam ist.

In früheren Untersuchungen (34) war gefunden worden, daß ein Gemisch essentieller Aminosäuren im Inkubationsmedium die hemmende Wirkung von ACDOC bei EAT-Zellen abschwächen kann. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine einzige Aminosäure dieses Gemisches diesen Effekt verursacht.

Das Gemisch enthält Arginin, Cystin, Glutamin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin. Phenylalanin war bei allen Versuchen als radioaktiver Marker im Medium und kann daher keinen Einfluß haben. Keine dieser Aminosäuren, einzeln dem Medium zugegeben, vermochte die ACDOC-Wirkung aufzuheben, nur Glutamin vermindert sie, auch Histidin scheint sie abzuschwächen. Gleichzeitig hat Glutamin einen stark fördernden Effekt auf die Proteinsynthese und auf den Gesamtstoffwechsel.

Im Gegensatz zum Uridin-Einbau erwies sich der Phenylalanin-Einbau in Kontrollzellen als sehr abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Mediums. Leucin in der Konzentration $188 \mu\text{M}$ vermag die Proteinsynthese gegenüber der Zellinkuba-

tion ohne Aminosäuren nur gering zu steigern, das Aminosäuregemisch in der Konzentration 188 μM (= Summe der einzelnen Aminosäurekonzentrationen) steigert sie auf das vierfache. Auch die übrigen Aminosäuren des Gemisches scheinen einzeln die Proteinsynthese nicht stimulieren zu können; die Ausnahme ist Glutamin. Glutamin (2 mM) steigert die Proteinsynthese beinahe auf die Hälfte des Wertes bei Zugabe des Aminosäuregemisches (Gesamtkonzentration aller Aminosäuren 1,9 mM). Umgekehrt sinkt die Proteinsynthese auf unter 20 % bei Zugabe eines Aminosäuregemisches, dem Glutamin fehlt. Mögliche Erklärungen sind die Bereitstellung von Energie oder von Aminogruppen. Es wurde daher auch die andere Aminosäure mit einer Säureamidgruppe untersucht, Asparagin. Asparagin vermag die Proteinsynthese aber nur auf das 1,5-fache des Wertes ohne Aminosäurezugabe zu steigern, die Hemmwirkung von ACDOC wird nicht vermindert. Die zugrunde liegenden Säuren Glutaminsäure und Asparaginsäure sind ohne Effekt auf Proteinsynthese und ACDOC-Wirkung. Es ist wahrscheinlich, daß der Mechanismus der Proteinsynthesestimulierung auch die Ursache der Hemmungsabschwächung von ACDOC durch Glutamin ist.

Der nur sehr geringe Effekt von Histidin auf die ACDOC-Wirkung kann durch eine Wechselwirkung Chinon-Imidazolring verursacht sein. Im Allgemeinen scheint es aber zu keiner bedeutenden Reaktion von ACDOC mit den Aminosäuren des Inkubationsmediums zu kommen, da eine Veränderung der Aminosäurekonzentration keine Veränderung der ACDOC-Wirkung nach sich zog. Cystein, das wahrscheinlich mit seiner freien SH-Gruppe mit einem Chinon reagieren würde, war im Aminosäuregemisch nicht enthalten. Cystin konnte auch in hoher Konzentration die ACDOC-Wirkung nicht verhindern.

ACDOC vermag die Leucyl-tRNA-Synthetase in einem in-vitro-System zur Aminoacylierung von tRNA zu hemmen (35), wobei sowohl die tRNA als auch das Enzym aus EAT-Zellen stammen. In demselben System verhindert auch 1,4-Naphthochinon die Beladung der tRNA mit Leucin bei einer niedri-

geren Konzentration als ACDOC. Es kann angenommen werden, daß beide Chinone über denselben Mechanismus die Enzymhemmung bewirken. Die Leucyl-tRNA-Synthetase hat in ihrem aktiven Zentrum für die Katalyse essentielle SH-Gruppen (Cystein-Seitenketten), die wahrscheinliche Angriffspunkte der Chinone sind. Dieser Hemmechanismus konnte an hochgereinigter Leucyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* nachgewiesen werden (38,53). Im Gegensatz zu Bakterien ist die Leucyl-tRNA-Synthetase in EAT-Zellen wahrscheinlich nicht der primäre Angriffspunkt der Chinone (35). Andere Untersuchungen mit EAT-Zellen und Chinon zeigten eine Hemmung der Initiation der Proteinsynthese; es wurden keine Hinweise auf einen vorzeitigen Abbruch der in Synthese befindlichen Proteinketten gesehen (54).

Die RNA- und DNA-Synthese könnten unabhängig von der Proteinsynthese direkt durch eine Chinonwirkung beeinflußt werden oder indirekt durch einen primären Eingriff in die Proteinsynthese. Denkbare Angriffspunkte der Chinone sind auch der Elektronentransport in der Atmungskette oder Wirkungen in der Zellmembran.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Wöhler, F. (1838)
Ann. Pharm. 24, 241
- 2 Thalhimer, W. and Palmer, B. (1911)
J. Infekt. Diseases 9, 181
- 3 Porter, T.H. und Folkers, K. (1974)
Angew. Chem. 86, 635
- 4 Thompson, P.E. and Werbel, L.M. (1972)
Antimalarial Agents, Chemistry and Pharmacology
Academic Press, New York
- 5 Cancer Chemotherapy Reports, Part 2,
Vol.4, No.4 (1974) des National Cancer Institut, USA
- 6 Grundmann, E., Jühling, L., Pütter, J. und Seidel,
H.J. (1969)
Z. Krebsforschung 72, 185
- 7 Sokal, G., Trouet, A. and Michaux, I.L. (1973)
Eur. J. Cancer 9, 391
- 8 Blum, R.H. und Carter, S.K. (1974)
Ann. Intern. Med. 80, 249
- 9 Folin, O. (1922)
Biol. Chem. 51, 377
- 10 Sullivan, M.X. (1926)
Public Health Rept. (U.S.) 41, 1030
- 11 Cooper, E.A. (1913)
Biochem. J. 7, 186
- 12 Ellinger, A. (1923)
Im "Handbuch der experimentellen Pharmakologie"
(A. Heffter, Ed.) Vol.1, S.871 Verlag Springer
- 13 Mason, H.S. (1955)
Nature 175, 771
- 14 Frieden, E., Westmark, G.W. and Schor I.M. (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 92, 176
- 15 Martius, C. and Nitz-Litzow, D. (1953)
Biochim. Biophys. Acta 12, 134
- 16 Wehrli, W., Staehelin, M. (1969)
The rifamycinsrelation of chemical structure and action
on RNA polymerase. Biochim. Biophys. Acta 182, 24-29
- 17 Kersten, H. (1975)
In "Handbook of Experimental Pharmacology" (Eichler,
O., Farah, A., Herken, H., Welche, A.D., Eds.) Vol.38/2
(Sartorelli, A.C. and Johns, D.G., Eds.) Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York

- 18 Kersten, H. (1962)
Biochim. Biophys. Acta 55, 558-560
- 19 Kersten, H. und Kersten, W. (1963)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 324, 141
- 20 Kersten, H., and Kersten, W. (1969)
In "Inhibitors-Tools in Cell Research" (Th. Bücher,
S. Sies, Eds.) pp 11-31, Springer-Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York
- 21 Iyer, V.N. and Szybalski, W. (1964)
Science 145, 55
- 22 Kersten, W., Kersten, H., Wanke, H. und Ogilvie, A.
(1969)
Zentr. Bakt. I. Abt. Orig. 212, 259
- 23 Kinoshita, S. et al. (1971)
J. Med. Chem. 14, 103
- 24 Kinoshita, S. et al. (1971)
J. Med. Chem. 14, 109
- 25 Ogilvie, A. (1976)
Habilitationsschrift Erlangen, S.23-24
- 26 Ogilvie, A. (1970)
Dissertation, Münster i.W.
- 27 Ogilvie, A., Wiebauer, K. and Kersten, W. (1975)
Biochem. J. 152, 511-515
- 28 Ogilvie, A. (1976)
Habilitationsschrift Erlangen
- 29 Wanke, H. (1971)
Dissertation, Münster i.W.
- 30 Wiebauer, K. (1974)
Diplomarbeit, Erlangen
- 31 Wiebauer, K. (1979)
Dissertation, Erlangen
- 32 Ogilvie, A., Wiebauer, K., Spitzbarth, P. and
Kersten, W. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 407, 357-364
- 33 Ogilvie, A., Wiebauer, K., and Kersten, W. (1975)
Biochem J. 152, 517-522
- 34 Ogilvie, A., Frank, G., und Kersten, W. (1975)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 356, 259
- 35 Huschka, U. (1979)
Dissertation, Erlangen
- 36 Kuschinsky, G. und Lüllmann, H.
"Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie", 6.Aufl. 1974,
Thieme Verlag

- 37 Mutschler, E.
Arzneimittelwirkungen, 3.Aufl. 1975, Stuttgart
- 38 Ogilvie, A. and Kersten, W. (1979)
"Quinone Antibiotics" S.253-254 in Antibiotics V/1,
Mechanism of Action of Antibacterial Agents, Edited
by F.E. Hahn, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
- 39 Webb, I.L. (1966)
Enzyme and Metabolic Inhibitors, Vol.III Academic
Press, New York
- 40 Patai, S. (Ed.) (1974)
The Chemistry of the Quinoid Compounds, part 1 and 2
John Wiley and Sons, London
- 41 Morton, R.A. (Ed.) (1965)
Biochemistry of Quinones, Academic Press, New York
- 42 D'Ans, Lax
Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Band II, S.255
Springer Verlag 1964
- 43 Katalog der Grand Island Biological Company (GIBCO)
1972/73
a) J. Exp. Med., 99, 167 (1954)
b) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71, 196 (1949)
c) Natl. Cancer Inst., 4, 167 (1943)
- 44 Eagle, H. (1959)
Science, 130, 432
- 45 Andreeff
Zellkinetik des Tumorwachstums, Thieme 1977, S.24
- 46 Paul, John
Ascites tumors, S.304-307 in: Cell and Tissue Cul-
ture, Livingstone 1972
- 47 Holmberg, B. (1961)
Exp. Cell. Res., 22, 406
- 48 Andreeff, a.a.O., S.68
- 49 Taylor, M.W., Buck, C.A., Granger, G.A. and Holland,
J.I. (1968)
J. Mol. Biol. 33, 809
- 50 Jacobson, Juarez, H., Hedgcoth, C. and Consigli, R.A.
(1974)
Arch. Biochem. Biophys. 163, 666
- 51 Karzel, K., Breull, W. (1968)
Arzneimittelforschung 18, 1504
- 52 Ogilvie, A., Lämmermann, M., Wiebauer, K., and
Kersten, W. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 395, 136-145

- 53 Wiebauer, K., Ogilvie, A., Kersten, W. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 327-332
- 54 Ogilvie, A., Kroczeck, W., Frank, S.C., and Kersten,
W. (1979)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 360, 1181
- 55 Andreeff, a.a.O., S.71

Herrn Prof. Dr. W. Kersten danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die uneingeschränkte Förderung bei der Durchführung der Arbeit.

Sehr dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. A. Ogilvie für die Überlassung des Themas, für die ständige unermüdlige Hilfe und kritische Diskussion bei der Durchführung; für die freundschaftliche Aufnahme in den Arbeitskreis und für seine Geduld.

Lebenslauf

Am 15.10.1952 wurde ich, Wolfgang Kroczeck, als erstes Kind des Dipl.-Volkswirtes Anton Kroczeck und seiner Frau Magda, geb. Stuttrucker in Erlangen geboren. Nach der Grundschule (ab September 1959) besuchte ich das Hans-Sachs-Gymnasium (mathem.-naturwiss.) in Nürnberg und legte dort im Juni 1972 das Abitur ab.

Im WS 1972/73 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Hohenheim (Baden-Württemberg) und setzte es ab dem SS 1973 an der Universität Erlangen-Nürnberg fort bis zum Abschluß mit dem 3. Teil der ärztlichen Prüfung im Mai 1979.

Seit August 1979 bin ich als Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie des Städt. Klinikums Nürnberg beschäftigt.

Die vorliegende Arbeit wurde im WS 1974/75 am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, Direktor Prof. Dr. W. Kersten, unter der Leitung von Prof. Dr. A. Ogilvie begonnen.

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen